

**Immunhistochemische Kollokalisierung der  
Apoptoserepressoren ARC und FLIP<sub>s</sub> in Myokardbiopsien  
bei dilatativer Kardiomyopathie**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von                   Derek Veit Manfred Ott  
geboren am   21.04.1978       in   Cuxhaven**

**Gutachter:** 1. Prof. Dr. Jirikowski, Jena  
2. Prof. Dr. Baukrowitz, Jena  
3. Prof. Dr. Amselgruber, Stuttgart

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.05.2004**

## Liste der verwendeten Abkürzungen

ARC	Apoptosis repressor with a CARD
AF	Autofluoreszenz
AfV	Autofluoreszenzverlust
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor 1
ARVCM	Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
BrdU	Bromdesoxyuridin
CARD	Caspase recruitment domain
Caspase	Cystein-Aspartat-spezifische Proteinase
DAB	Diaminbenzidin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DD	Death domain
DED	Death effector domain
EF	Ejektionsfraktion
FADD	Fas associated death domain
Fas	CD95 Rezeptor
FLIP <sub>(S)</sub>	(small) FLICE inhibitory protein
FLICE	= Caspase-8
HCM	Hypertrophische Kardiomyopathie
HRP	Horseradish peroxidase
IAP	Inhibitor of apoptosis
ISEL	In situ nick endlabeling
KHK	Koronare Herzkrankheit
NKCM	Nichtklassifizierbare Kardiomyopathie
NYHA	New York Heart association

PAP	Peroxidase-antiperoxidase
PBS	Phosphate-buffered saline
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
tTG	Tissue transglutaminase
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated BrdU nick end labelling
WHO	World Health Organisation

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	
<b>1.1.</b>	<b>Kardiomyopathien</b>	1
1.1.1.	Definition und Einteilung	1
1.1.2.	Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)	2
<b>1.2.</b>	<b>Die Herzbiopsie</b>	3
<b>1.3.</b>	<b>Apoptose</b>	4
1.3.1.	Begriffsbestimmung	4
1.3.2.	Apoptose im Herzgewebe	5
1.3.3.	Caspasen	6
<b>1.4.</b>	<b>Caspase-Inhibitoren</b>	9
1.4.1.	Allgemeines	9
1.4.2.	FLIP <sub>S</sub>	9
1.4.3.	ARC	10
<b>1.5.</b>	<b>Zielsetzung</b>	12
 <b>2. Material und Methoden</b>		
<b>2.1.</b>	<b>Material</b>	13
2.1.1.	Patientenkollektiv	13
2.1.2.	Gewinnung der Biopsien	13
2.1.3.	Einbettung und Herstellung der Semidünnschnitte	13
2.1.4.	Antikörper	15
<b>2.2.</b>	<b>Methoden</b>	15
2.2.1.	Entharzen	15
2.2.2.	Immunhistochemie mit anti-ARC und anti-FLIP <sub>S</sub>	15
2.2.3.	TUNEL-Färbung	16
2.2.4.	Mikroskopische Auswertung	17

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1.	Übersicht	19
3.2.	Autofluoreszenzverlust und TUNEL-Färbung	19
3.3.	ARC	22
3.4.	FLIP <sub>s</sub>	25
3.5.	Immunhistochemische Kontrollen	29
3.6.	Tabellarische Auswertung	29
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1.	Hochauflösende Immunhistochemie von Semidünnschnitten	36
4.2.	Morphologische Betrachtung	36
4.2.1.	ARC, FLIP <sub>s</sub> und der Autofluoreszenzverlust	36
4.2.2.	DNA-Fragmentierung und TUNEL-Färbung	40
4.3.	Funktionelle Bedeutung	42
4.3.1.	Zur bestehenden Vorstellung über die Apoptose	42
4.3.2.	Zur Vorstellung über den statischen Kardiomyozyten	43
4.3.3.	Zur Relevanz der Apoptose im kranken Herzen	44
<b>5.</b>	<b>Schlußfolgerung</b>	
5.1.	Anwendbarkeit der ARC- und FLIP <sub>s</sub> -Färbung	46
5.2.	Klinischer Ausblick	46
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	48
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	50
	<b>Danksagung</b>	56
	<b>Lebenslauf</b>	57
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	58

# 1. Einleitung

## 1.1. Kardiomyopathien

### 1.1.1. Definition und Einteilung

Der Begriff der Kardiomyopathien (*engl.* cardiomyopathies, CM) wurde erstmals in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts gebräuchlich und bezeichnete ursprünglich allgemein nichtkardiale Herzerkrankungen unklarer Ätiologie. Die WHO definierte sie 1980 als Erkrankungen des Herzmuskelgewebes, die nicht infolge eines Herzklappenfehlers, eines Bluthochdrucks, einer Koronaren Herzkrankheit (KHK) oder eines Lungenleidens entstanden sind. [Olbrich 2001]

Nach einer Überarbeitung dieser Definition durch eine WHO-Task-Force im Jahre 1995 unterscheidet man fünf verschiedenen Formen:

- Dilatative Kardiomyopathie (DCM)
- Restriktive Kardiomyopathie (RCM)
- Hypertrophische Kardiomyopathie (HCM)
- Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVCM) und
- Nichtklassifizierbare Kardiomyopathie (NKCM) [Richardson et al. 1996].

Die RCM (auch obliterative CM oder Eosinophile Endomyokardiale Erkrankung) ist in Mitteleuropa sehr selten und umfaßt zwei Krankheitsbilder: Die tropische Endomyokardfibrose und die *Endocarditis fibroplastica Löffler*, die durch einen normalgroßen linken Ventrikel mit eingeschränkter diastolischer Entspannungsfähigkeit (Compliance) gekennzeichnet ist [Thomas et al. 1996]

Die HCM tritt hierzulande mit einer Inzidenz von ca. 2,5 pro 100.000 Einwohner pro Jahr auftritt [Maisch 1998], in anderen Ländern wie z.B. Japan ist sie mit bis zu 17,3 Fällen pro 100.000 Einwohner allerdings die häufigste Form der CM [Matsumori et al. 2001]). Es handelt es sich dabei um eine asymmetrische Hypertrophie einzelner Abschnitte des linken Ventrikels, vorzugsweise des Septums. Sie tritt in ca. 50% der Fälle familiär gehäuft auf, weswegen ein autosomal-dominanter Erbgang vermutet wird. Klinisch unterscheidet man eine Hypertrophie mit bzw. ohne Obstruktion der Ausflußbahn [Maisch 1998].

Im Rahmen der ARVCM kommt es im rechten Ventrikel zu einer segmentalen Verdünnung des Myokards mit Einlagerung von Fett und Bindegewebe. Sie greift nur selten auf den linken Ventrikel über [Maisch 1998].

### **1.1.2. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)**

Die dilatative (oder auch kongestive) CM ist mit 5-8 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr die häufigste Form der primären Kardiomyopathien in Deutschland und zeigt eine steigende Inzidenz. Der Gipfel liegt zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr, Männer sind doppelt bis dreifach so häufig betroffen wie Frauen. In etwa 20-30% findet sich eine familiäre Häufung. [Olbrich 2001]

Es kommt zu einer hochgradigen biventrikulären Dilatation des Herzens bei mittelgradiger Hypertrophie (Durchschnittsgewicht 600g) [Thomas et al. 1996]. Die Ejektionsfraktion ist vermindert; je nachdem, wie stark die Auswurfleistung eingeschränkt ist, läßt sich die DCM nach der Tokyo-Klassifikation in vier Stadien (I-IV) einteilen [Maisch 1998]

Das klinische Bild wird durch die progrediente Herzinsuffizienz mit vordergründigem Rückwärtsversagen bestimmt. Die enddiastolischen Volumina der Ventrikel steigen an und Blut staut sich vor dem Herzen, die Patienten leiden unter peripheren Ödemen, Dys- und Orthopnoe. Im späteren Stadium kann sich darüber hinaus durch den stetigen Abfall der Ejektionsfraktion (EF) ein Vorwärtsversagen mit Minderperfusion der Organe entwickeln, des weiteren kommen Herzrhythmusstörungen, Lungen- und Organembolien und Synkopen vor. Gelegentlich werden auch typische oder atypische Angina pectoris-Anfälle bei normalen Herzkranzgefäßen beobachtet, da der hypertrophierte und dilatierte Herzmuskel nicht mehr adäquat versorgt werden kann. Thrombenbildung in den geweiteten und oft arrhythmischen Vorhöfen ist eine Quelle für periphere Embolien, die dann z.B. für einen apoplektischen Insult verantwortlich sein können. [Giannitsis et al. 2001]

Bei der auskultatorischen Untersuchung kann aufgrund der stetigen Erweiterung der Ventrikel eine relative Mitral- oder Trikuspidalklappeninsuffizienz mit den typischen systolischen Strömungsgeräuschen hörbar werden. Die EKG-Veränderungen sind mannigfaltig, aber unspezifisch. Am häufigsten zeigen sich Erregungsleitungsstörungen im Sinne eines Linksschenkelblocks, oft kommt es bei fortschreitender Erkrankung zu Vorhofflimmern. Der Röntgenthorax zeigt das vergrößerte Herz und die Stauung des Blutes in den Lungengefäßen. Die Echokardiographie erlaubt die beste Beurteilung des Ausmaßes der Krankheit. Hier können die Erweiterung der Ventrikel und Vorhöfe, eventuelle Herzklappeninsuffizienzen, eine ver-



minderte EF sowie intrakardiale Thromben genau beschrieben werden. In der Herzkatheteruntersuchung kann die hämodynamische Leistung des geschädigten Herzens gemessen werden [Giannitsis et al. 2001]. Die Echokardiographie liefert auch die zuverlässigsten prognostischen Hinweise, die eine bessere Vorhersage des Krankheitsverlaufes erlauben als das subjektive Empfinden oder der NYHA-Status bei Erstdiagnose [Schannwell et al. 2001]

Trotz aller diagnostischen Maßnahmen bleibt die dilatative Kardiomyopathie bei der regulären klinischen Untersuchung die Ausschlußdiagnose.

Therapeutisch stehen die Behandlung der Herzinsuffizienz und der Rhythmusstörungen im Vordergrund. Die Patienten müssen herzbelastende Gewohnheiten (Rauchen, Alkoholkonsum, körperliche Anstrengung) ablegen, ein bestehender Bluthochdruck muß medikamentös eingestellt werden und bei Vorhofflimmern oder vorangegangener Thrombembolie sind Antikoagulantien bzw. Antiarrhythmika indiziert. In der jüngeren Vergangenheit haben ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten wie Losartan außerdem positive Effekte gezeigt, die über die Senkung des Blutdrucks hinaus durch eine Wirkung unmittelbar am Herzen erklärt werden [deBlois et al. 2001]. Eine kausale Therapie der DCM besteht jedoch nicht und bei fortschreitender Insuffizienz des Organs mit unbeherrschten Komplikationen bleibt oft nur die Herztransplantation [Schannwell et al. 2001]

Die Erkrankung hat generell eine schlechte Prognose: 34% aller Patienten versterben in dem ersten Jahr nach Diagnosestellung, davon 50% an der progredienten Herzinsuffizienz, 25% am plötzlichen Herztod und weitere 25% an thrombembolischen Komplikationen oder anderen Ursachen. Aussagen über die 5-Jahres-Mortalität nach Erstdiagnose variieren zwischen 20% [Olbrich 2001] und 75% [Milting et al. 1999].

## **1.2. Die Herzbiopsie**

Die klinische Untersuchung gestattet lediglich den Verdacht auf eine dilatative Kardiomyopathie, da sie hierbei, wie einleitend schon erwähnt wurde, als Ausschlußdiagnose gilt. Eine großangelegte Studie an über 15.000 Patienten mit diagnostischer Linksherzkatheterisierung in den Jahren zwischen 1980 und 1988 zeigte jedoch, daß sich in über einem Drittel der Fälle die Diagnose DCM als falsch erwies, wohingegen bei ca. 40% der tatsächlich Erkrankten das Ergebnis falsch-negativ ausfiel [Figulla et al. 1992]

Verifiziert wurde die DCM hierbei anhand einer Endomyokardbiopsie. Im Mikroskop erkennt man dann schmale, gedehnte Myozyten mit einem hyperchromatischen Zellkern. Meist zeigen

sich Zeichen einer Fibrose und im Elektronenmikroskop findet man vermehrte Mitochondrien. Wichtig ist die Abgrenzung zur floriden Myokarditis, die klinisch nicht möglich ist und nur histologisch eindeutig gelingt. Einschränkend muß aber dazugesagt werden, daß der histologische Befund bei abgeheilter Myokarditis mit den feingeweblichen Befunden bei idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie identisch ist. [Maisch 1998]

Trotzdem gilt die Biopsie als unabdingbar zur definitiven Diagnosestellung [Sigusch et al. 1998].

Mittels eines Katheters, den man über die *A. femoralis* eingeführt, wird die Biopsienadel in den linken Ventrikel vorgeschoben und aus dem dortigen Myokard die Gewebeprobe entnommen.

### 1.3. Apoptose

#### 1.3.1. Begriffsbestimmung

Apoptose ist ein komplexer und noch in weiten Teilen unerforschter Vorgang, an dessen Ende sich eine Zelle aktiv, d.h. unter Bildung von mRNA und de novo-Proteinsynthese, zersetzt. Daher wurde der Prozeß auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet. Der Begriff selbst wurde aus dem Griechischen hergeleitet (ἀποπτῶσις) und bedeutet etwa „das Herabfallen der Blätter“. An ein solch herbstliches Szenario fühlte sich der Morphologe Kerr, Erstbeschreiber und Namensgeber dieses Prozesses, wohl vor allem durch den Zerfall der Zellen in kleinere Vesikel, wie er weiter unten ausführlicher besprochen wird, erinnert [Kerr et al. 1972]. Die Apoptose

242

J. F. R. KERR, A. H. WYLLIE AND A. R. CURRIE

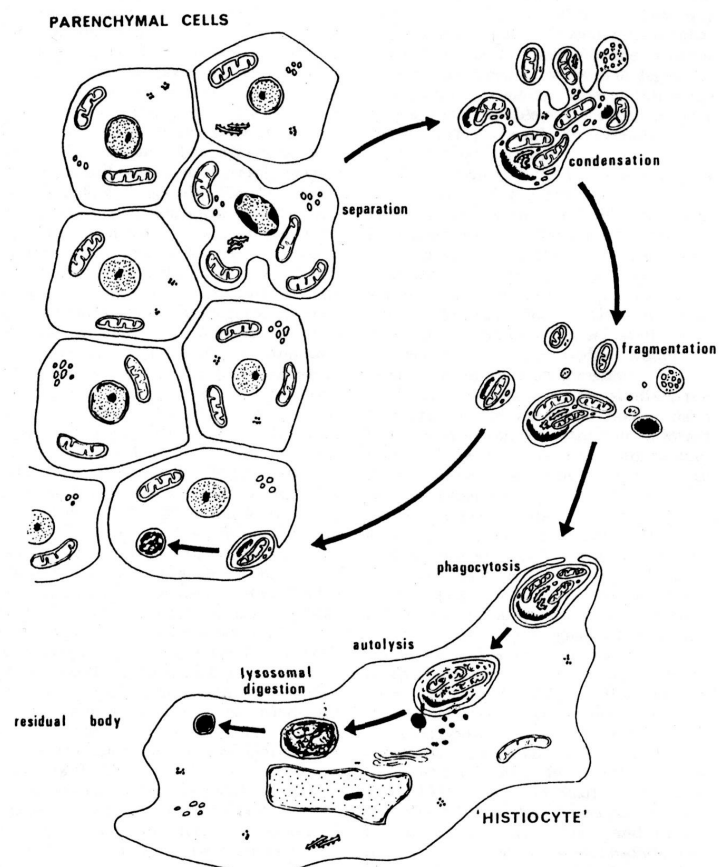


FIG 5 —Diagram to illustrate the morphological features of apoptosis.

Abb. 1: Aus Kerrs Arbeit, in der erstmals die Apoptose beschrieben wurde [Kerr et al. 1972]

ist unentbehrlich für Entwicklung, Differenzierung und Gewebshomöostase des Vielzellers durch Entfernung alter, ausgedienter oder geschädigter Zellen [Vaux und Strasser 1996]. Sie unterscheidet sich grundlegend von der Nekrose (von manchen Autoren auch als „Onkose“ bezeichnet), bei der Zellen durch Noxen akut so stark geschädigt werden, daß alle Kompensations- und Reparationsmechanismen versagen, die Membranintegrität zerstört wird und die Zellen letztendlich anschwellen und platzen, ihre Inhalte freisetzen und in der Folge eine Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe hervorrufen [Chinnaiyan et al. 1996 A, Narula et al. 1996]

Wie Apoptose im Detail zu definieren sei und v.a. welche Kriterien erfüllt sein müssen, damit man eine Zelle als apoptotisch bezeichnen darf, ist umstritten. Typische Charakteristika des programmierten Zelltodes sind

- Zerkleinern der DNA in internucleosomale Fragmente (DNA-Fragmentierung)
- Einfaltungen der Zellmembran und Vesikelabschnürungen („membrane-blebbing“)
- Abbau der Stützsubstanz des Zelleibes (v.a. Actin)
- Auflösen der Zelle in kleine Vesikel (Apoptosekörperchen), die für Freßzellen kenntlich gemacht und so, ohne eine Entzündung auszulösen, entsorgt werden [Chinnaiyan et al. 1996 B].

Allerdings zeigen viele Zellen einzelne Veränderungen i.S. einer Apoptose, ohne dabei im Begriff zu sein, den programmierten Zelltod zu begehen. [Communal et al. 2002]. Darüber hinaus unterliegt die Apoptose einer Reihe von gewebs- und situationsspezifischen Eigenheiten, was eine Standardisierung des Begriffes erschwert.

Störungen der Apoptose spielen bei vielen Krankheiten eine ausschlaggebende Rolle, so z.B. bei malignen Entartungen, beim Acquired Immune Deficiency Syndrome, neurodegenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose oder bei Autoimmunprozessen [Thompson et al. 1995].

### **1.3.2. Apoptose im Herzgewebe**

Durch die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des Herzgewebes wird der Apoptose hier ein besonderer Stellenwert beigemessen [Maulik et al. 1999]. Es handelt sich, nach allgemeiner Lehrmeinung, wie bei Nervengewebe, um sog. Ruhegewebe, d.h. daß die Zellen kurz nach der Geburt ihre Teilungsfähigkeit verlieren und das Organ nicht in der Lage ist, die durch

programmierten oder akzidentiellen Zelltod verlorene Substanz nachzubilden [Gurevich et al. 1999]

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, daß eine Reihe von Stimuli bzw. Noxen Kardiomyozyten in den programmierten Zelltod treiben, wie z.B. Hypoxie, Minderperfusion, mechanische Dehnung bei dauerhafter Volumenbelastung des Organs oder chronischem Herzversagen. [Narula et al. 1996, Olivetti et al. 1997]. Darüber hinaus ließen sich bei fast jeder Art kardialer Schädigung, wie z.B. akuter viraler Myokarditis, Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantation, instabiler Angina pectoris, aber auch im Endstadium der DCM, erhöhte Gewebsspiegel an TNF $\alpha$  finden. Die klinische Signifikanz dieser Befunde ist allerdings unklar, zumal TNF $\alpha$  über verschiedene Mechanismen Apoptose sowohl triggern als auch inhibieren kann. [Gurevich et al. 1999]

Welches der genaue Mechanismus ist, über den z.B. Ischämie- bzw. Reperfusionsschäden entstehen, wird noch diskutiert. Fest steht, daß neben dem unmittelbaren Infarktgebiet, in welchem die Zellen durch die akute massive Schädigung nekrotisch werden, es einen breiten Randsaum gibt, in dem die Zellen nicht sofort abgetötet werden, sondern erst mit etwas Verzögerung der Apoptose anheimfallen [Bialik et al. 1997]. Als auslösende Faktoren für diesen Vorgang vermutet man unter anderem ATP-Mangel, Azidose, reaktive Sauerstoffverbindungen (Radikalbildung), unzulänglichem Abtransport von Stoffwechselendprodukten oder gesteigerte intrazelluläre Calciumkonzentrationen während der Ischämie (resp. Reperfusion), die dann die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirken und damit die Caspase-Kaskade (siehe unten) aktivieren [Ekhterae et al. 1999]

Experimente am Tier bzw. in vitro konnten zeigen, daß die Gabe von Apoptosehemmern unter Ischämie die Infarktgröße erheblich zu reduzieren vermochte. Ähnliches gilt im übrigen auch für das Gehirn [Rudel et al. 1999, Thornberry et al. 1998]. Doch bereitet die Umsetzung dieses Wissens in der Praxis noch viele Schwierigkeiten [Narula et al. 1998].

### 1.3.3. Caspasen

Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Proteinasen) sind Enzyme, die durch verschiedenste Stimuli aktiviert werden können und den Ablauf der Apoptose in großen Teilen steuern. Bis heute sind 14 dieser Proteine bekannt [Pistritto et al. 2002]. Sie werden als inaktive Precursor exprimiert und können jederzeit durch Proteolyse in die enzymatisch wirksame Form überführt werden [Chinnaiyan und Dixit 1996]. Diese unreifen Caspasen enthalten selbst auch

eine Cystein-Aspartat-Erkennungsregion, so daß Autokatalyse bei der Aktivierung der Caspasen offenbar eine entscheidende Rolle spielt. Durch das konstitutive Vorliegen der Caspasen in den Zellen müssen sie in der Initialphase des programmierten Zelltodes nicht mehr eigens gebildet werden und der Zellsuizid kann selbst dann durchgeführt werden, wenn die Proteinbiosynthese zum Erliegen gekommen ist. [Nicholson und Thornberry 1997, Rudel et al. 1999]

Der Vergleich hat gezeigt, daß - ungeachtet der Vielzahl von Faktoren, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind - der letztendliche Ablauf des programmierten Zelltodes weitgehend gleichartig vonstatten geht, nicht nur in verschiedenen Zelltypen, sondern auch in den verschiedenen Tierspezies. Die Tatsache, daß die kaskadenartige Signalkette der Caspasen in ähnlicher Weise durch die Evolution hindurch erhalten blieb, erlaubte es den Forschern, Erkenntnisse, die an einfacheren Organismen, wie z.B. *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, einem Fadenwurm, gewonnen wurden, auf die Säugetierzelle zu übertragen [Ashkenazi et al. 1998]

Zwar sind die Verhältnisse im höheren Lebewesen komplizierter geworden, doch zeigen beispielsweise alle Caspasen strukturelle Ähnlichkeiten zum apoptosefördernden Enzym CED-3, das bei *C. elegans* entdeckt wurde, bzw. zum Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) der Säugetiere [Yuan et al. 1993]. Eine Deletion des Genes für CED-3 läßt bei dem Fadenwurm alle 131 Zellen, die im Laufe der Ontogenese gezielt absterben würden, weiterleben und führt so zu Entwicklungsstörungen [Nicholson und Thornberry 1997].

Die Aktivierung der Caspasen kann beispielsweise vom Tumorsuppressor-Protein p53 ausgehen, das u.a. DNA-Schäden registriert oder z.B. durch übermäßige Zelldehnung aktiviert wird und, sollten die Reparaturmechanismen überfordert sein, die Apoptose einleitet. [Chao et al. 2000, Leri et al. 1998, Gurevich et al. 1999]

Des weiteren reagieren Mitochondrien auf eine Reihe von Noxen, wie z.B. UV-Strahlung, Hyperosmolalität, Intoxikation mit gewissen Chemotherapeutika oder Überlastung mit Sauerstoffradikalen mit einer Verminderung des elektrischen Potentials über ihrer Membran ( $\Delta\Psi_m$ ), was in der Konsequenz zu Porenbildung, gesteigerter Durchlässigkeit und damit der Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol führt, welches sich dort mit Apaf-1 zum sogenannten Apoptosom zusammenlagert und dann Caspase-9 proteolytisch aktiviert. Caspase-9 ist (wie Caspase-8) eine proximale (oder Initiator-)caspase, die am Anfang der apoptotischen Kaskade steht und distale (oder Effektor-) caspasen, wie z.B. Caspase-3 oder -7 induziert [Green et al. 1998, Neuss et al. 2001]. Neuere Veröffentlichungen legen des weiteren nahe, daß eine gewisse Fraktion an Caspase-9 bereits aktiviert innerhalb der Mitochondrien vorliegt und dann

zeitgleich mit Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt wird [Costantini et al. 2002]. Ein wichtiges Enzym, das in der Folge von Caspase-3 inaktiviert wird, heißt DNA fragmentation factor 45/inhibitor of caspase-activated DNase (DFF45/ICAD) [Condorelli et al. 2001]. Seine proteolytische Inaktivierung führt zu der Freisetzung und Aktivierung der assoziierten DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase (DFF40/CAD) einem endogenen DNase Enzym, das für die internukleosomale DNA Fragmentierung während der letzten Phase der Apoptose verantwortlich ist [Dispersyn et al. 2001]. Diese DNA-Fragmente sind es, die in der Folge durch das sogenannte TUNEL-Verfahren dargestellt werden können [Negoescu et al. 1996].

Eine weitere Möglichkeit, den programmierten Zelltod einzuleiten besteht darin, daß Zellen über sog. Death-Receptors von außerhalb den Befehl erhalten, sich aufzulösen. Die bekanntesten gehören zur Familie der tumor-necrosis-factor (TNF)-Rezeptorfamilie, zu welcher auch ein Fas (oder auch Apo1 bzw. CD95) genannte Rezeptor gehört [Hennino et al. 2000]. Aktivierung von Fas durch seinen Liganden (FasL) auf der extrazellulären Seite führt intrazellulär zu einer Anlagerung von unreifer Caspase-8 (auch FLICE) über ein FADD genanntes Verbindungsprotein an Fas und damit zu seiner Aktivierung [Ashkenazi et al 1998, Muzio et al. 1996]. Caspase-8 führt dann über andere Caspasen (v.a. Caspase-3) zu einer Reihe von Induktionen (z.B. zum oben bereits erwähnten DNA fragmentation factor DFF) bzw. Inhibitionen (z.B. der focal-adhesine-kinase FAK, welche die Bindung der Zelle an das umgebende Gewebe sichert oder der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase PARP, die an Reparaturvorgängen an der DNA beteiligt ist) wichtiger funktioneller Enzyme.

Im Ergebnis kommt es

- zum Stop des Zellzyklus'
- zum Erliegen sämtlicher Reparaturprozesse bzw. der homöostatischen Regulation
- zur Lösung der Zelle aus dem Verband
- zum Abbau struktureller Komponenten und
- zur Kenntlichmachung der Zelle für Phagozyten, was dem vorher beschriebenen Bild der Apoptose entspricht [Nicholson und Thornberry 1997].

Caspasen können als eine Art Spätmarker des programmierten Zelltodes betrachtet werden, da sie vor allem nach dem Zusammenbruch der Atmungskette vermehrt enzymatisch aktiviert werden [Neuss et al. 2001].

In jüngster Vergangenheit ist eine ähnliche Gruppe von Serin-spezifischen Proteasen beschrieben worden, die man folglich als Serpasen bezeichnete [Grabarek et al. 2002].

## 1.4. Caspase-Inhibitoren

### 1.4.1. Allgemeines

Faktoren, die in der Lage sind, Apoptose auf Ebene der Caspasen aufzuhalten, wurden erstmals bei der Erforschung von Viren beschrieben. Es überrascht nicht, daß Viren sich dieses Mittels bedienen, da eine durch immunkompetente Zellen (v.a. zytotoxische T-Lymphozyten) rezeptorvermittelte Abtötung infizierter Zellen einen wichtigen Abwehrmechanismus des Vielzelllers darstellt [Vaux und Strasser 1996]. Zu nennen seien z.B. der cytokine-response-modifier A (CrmA), der als Bestandteil des Kuhpocken-Virus entdeckt wurde und Caspase-8 inhibiert oder p35, das von Baculo-Viren exprimiert wird und fast alle Caspasen in ihrer Aktivität behindert [Rudel et al. 1999].

Später erst fand man dann Proteine mit ähnlicher Funktion im menschlichen Genom codiert, wie z.B. die inhibitors-of-apoptosis (IAPs) [Chinnaiyan et al. 1996 B] oder die Bcl-2-Familie, die allerdings auch proapoptotische Proteine umfaßt. [Adams und Cory 1998]. Zu den IAPs gehört auch das neuronal-apoptosis-inhibitor-protein (NAIP), das bei Individuen mit spinaler Muskelatrophie (SMA) teilweise deletiert ist [Rudel et al. 1999].

### 1.4.2. FLIPs

FLIPs (FLICE-inhibitor proteins) sind aufgrund der Tatsache, daß sie von mehreren Gruppen unabhängig voneinander beschrieben wurde, unter verschiedenen Synonymen bekannt, wie z.B. Casper [Shu et al. 1997], I-FLICE [Hu et al. 1997], FLAME-1 [Srinivasula et al. 1997], CASH [Goltsev et al. 1997] oder Usurpin [Rasper et al 1997].

Auch FLIPs wurden zuerst in Viren entdeckt, unter anderem bei dem mit dem Kaposi-Sarkom assoziierten Humanem Herpesvirus-8. [Thome et al. 1997]. Diese wurden dann als v-FLIPs den später entdeckten säugetiereigenen c-FLIPs gegenübergestellt [Tschopp et al. 1998].

FLIPs sind kompetitive Gegenspieler der Caspase-8. Es gibt mehrere Isoformen, die aber alle mindestens ein strukturelles Merkmal mit Caspase-8 gemeinsam haben: die sogenannte death effector domains (DEDs), jene zwei Domänen, die sich an die DEDs von FADD anlagern und somit Bindung an den Fas-Rezeptor ermöglichen [Yoshikawa et al 2000]. Ebensogut können FLIPs, ebenfalls über die DED, an die homologe Region von FLICE binden und so die Interaktion zwischen Caspase-8 und dem Fas-Rezeptor behindern. [Irmmler et al. 1997, Tschopp et al. 1998]

Caspase-8 besitzt daneben noch einen zweiten Teil, der das proteolytisch aktive Zentrum beherbergt. FLIPs unterscheiden sich hierin sowohl von FLICE als auch voneinander: FLIP<sub>L</sub> (oder FLIP $\alpha$ ), die längste Variante, ist durch den Austausch zweier kritischer Aminosäuren im aktiven Zentrum proteolytisch inaktiv. FLIP<sub>S</sub> (FLIP $\delta$ ), um das es hier im weiteren vornehmlich gehen wird, besteht hingegen nur noch aus den DEDs [Tschopp et al. 1998]. Dazwischen konnten noch die mRNA für die FLIP $\beta$  und FLIP $\gamma$  genannten Moleküle gefunden werden, bei denen noch unterschiedlich lange Reste der bei Caspase-8 aktiven Domäne vorhanden sind – der direkte Nachweis dieser Proteine selbst blieb aber aus. [Kirchhoff et al. 2000]

Durch Kopplung an FADD über die DEDs verhindern FLIPs die Aktivierung von FLICE und der sich daran anschließenden apoptotischen Kaskade. Der programmierte Zelltod, der z.B. durch  $\gamma$ -Strahlen oder Chemotherapeutika induziert wird, kann durch FLIP jedoch nicht unterbunden werden, da er mitochondrial vermittelt wird und Caspase-8 nicht erfordert [Kataoka et al. 1999]. FLIPs werden in vielen Geweben exprimiert, insbesondere in Herzgewebe, Skelettmuskel und Niere. [Tschopp et al. 1998]

### 1.4.3. ARC

Für ARC (apoptosis regulator with caspase recruitment domain) ließen sich zwei verschiedene Mechanismen nachweisen, über die das Protein die Apoptose zu inhibieren vermag.

Zum einen besitzt es die sog. caspase recruitment domain (CARD), über welche das Enzym die Caspasen –2 und –8 an den ihren DEDs bindet und damit blockiert, ohne jedoch z.B. mit den Caspasen –1, –3 oder –9 reagieren zu können. Es hemmt somit, genauso wie FLIP, die durch Rezeptoren vermittelte Apoptose [Hofmann et al. 1997; Koseki et al. 1998].

Darüber hinaus konnten Ekhteraei et al. 1999 nachweisen, daß ARC die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien als ersten Schritt des von diesen Organellen eingeleiteten Apoptoseweges unterbindet. Dabei scheint ARC das Membranpotential  $\Delta\Psi_m$  zu stabilisieren, das normalerweise durch die Einwirkung z.B. von Sauerstoffradikeln, herabgesetzt werden würde. In der Konsequenz würden sich Poren öffnen, über die dann neben Cytochrom c auch noch andere proapoptotische Substanzen, wie z.B. Hitzeschockprotein 10 und Smac/DIABLO, ins Zytosol freigesetzt würden [Costantini 2002]. ARC konnte in Studien dadurch sowohl Apoptose als auch Nekrose durch Überlastung von Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verhindern [Neuss 2001].



Northern-Blot-Analysen ergaben einen hohen Gehalt an ARC-mRNA in Herz- und Skelettmuskel, aber nicht in Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Niere, Pankreas oder diversen lymphatisch-hämatopoetischen Geweben [Koseki et al. 1998].

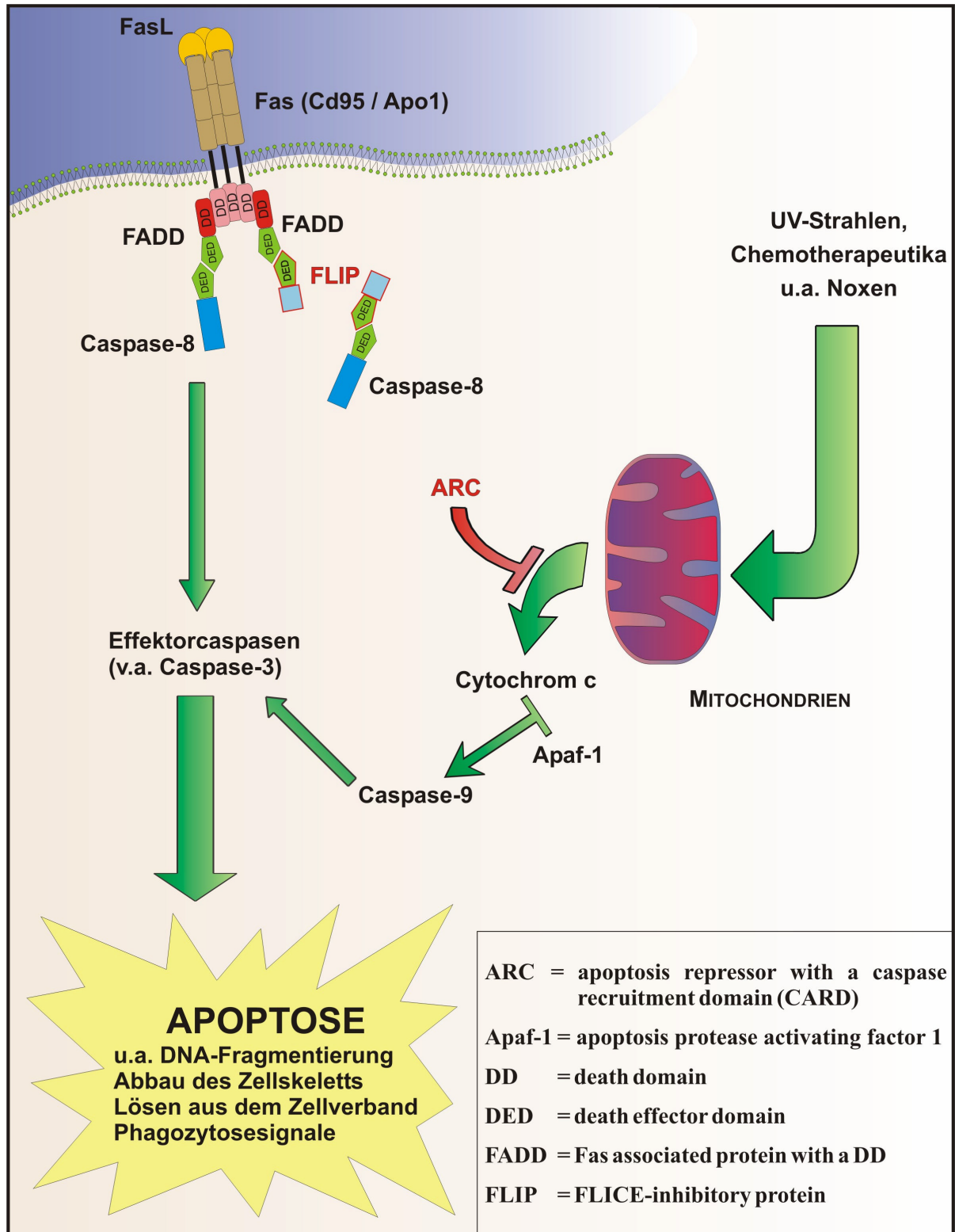


Abb. 2: Die Graphik verdeutlicht die Signalübertragungswege der rezeptorvermittelten (am Beispiel des Fas-Rezeptors) und der mitochondrial eingeleiteten Apoptose, sowie die Mechanismen, über die FLIP und ARC den programmierten Zelltod inhibieren können. ARC kann, wie hier für FLIP dargestellt, Caspase-8 auch über seine CARD kompetitiv hemmen.

## 1.5. Zielsetzung

Die Technik des Semidünnschnitts ist ein hochauflösendes Verfahren, bei dem eine ganze Schnittserie durch eine einzige Zelle gelegt werden kann. Damit wird es ermöglicht, vergleichende immunhistochemische Färbungen durchzuführen und z.B. die Kolokalisation verschiedener Proteine innerhalb einer Zelle zu beurteilen. Die Möglichkeiten einer morphologischen Studie am Lichtmikroskop werden somit bis an ihre Grenzen ausgeschöpft.

In dieser Arbeit wurden FLIP<sub>S</sub> und ARC im Herzgewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie immunhistochemisch nachgewiesen und ihre Verteilung im Gewebe bzw. in den einzelnen Zellen miteinander verglichen. Darüber hinaus wurden die Zellen auf DNA-Fragmentierung und Actin-Verlust, zweier Charakteristika der Apoptose, untersucht.

Dies könnte Aufschluß über das Apoptoseverhalten der Kardiomyozyten während der DCM geben, bzw. darüber, welche Mechanismen zum Überleben oder Absterben des geschädigten Herzgewebes beitragen. Die Dynamik der Apoptose ist im Herzgewebe von ganz außerordentlichem Interesse, allein schon wegen der hohen Inzidenz von Herzerkrankungen und der damit einhergehenden Mortalität (und Kosten).

Das Ausmaß der Zellen, die Anzeichen der Apoptose aufweisen, soll u.a. in Hinblick auf das noch weitestgehend gültige Dogma, demzufolge Herzmuskelzellen nicht zu Regeneration oder Zellteilung befähigt sind, betrachtet werden. Eine große Zahl an apoptotischen Zellen (wie sie schon in früheren Arbeiten beschrieben wurde) stellt die Vorstellung, daß Apoptose einen unumkehrbaren Prozeß darstellt in Frage, oder auch die Idee eines statischen Ruhegewebes, da ansonsten ein fulminanter Krankheitsverlauf zu erwarten wäre, der klinisch allerdings nicht zu beobachten ist.

Zusammenfassend läßt sich dies auf folgende konkrete Fragestellungen reduziert:

- Wie groß ist die relative Anzahl an FLIP<sub>S</sub>- respektiv ARC-positiven Zellen?
- Inwieweit korreliert der FLIP<sub>S</sub>- respektive ARC-Nachweis mit apoptotischen Erscheinungen wie DNA-Fragmentierung und Aktinabbau?
- Lassen sich Unterschiede im Ausmaß der Anfärbbarkeit des Herzgewebes für FLIP<sub>S</sub>- respektive ARC im Patienten mit DCM im Vergleich mit Herzgesunden finden?
- Welche Bedeutung kann in der Folge apoptotischen und antiapoptotischen Prozessen im Rahmen der DCM beigemessen werden?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Patientenkollektiv

Für diese Arbeit wurden die Biopsien von insgesamt 9 Patienten mit der klinisch gesicherten Diagnose einer dilatativen Kardiomyopathie ausgewertet.

Es handelt sich dabei um männliche Patienten, zwischen 42 und 62 Jahren (Durchschnittsalter 52,1) mit eingeschränkter Ejektionsfraktion (EF) zwischen 16 und 50%

#### 2.1.2. Gewinnung der Biopsien

Das histologische Material wurde zwischen Juli und November 1999 an der Klinik für Innere Medizin III in Jena mittels eines Katheters, der über die A. femoralis eingeführt wurde, aus dem linken Ventrikel entnommen. Die Biopsie selbst wurde mit einem *Cordis long sheath bioptome* durchgeführt, jedem der Patienten wurden dabei 6-8 Proben entnommen.

Als Kontrolle diente Gewebe aus dem linken Ventrikel zweier gesunder Herzen von Unfall-opfern, die ursprünglich für eine Transplantation vorgesehen waren, jedoch nicht eingesetzt wurden.

Unmittelbar nach Gewinnung wurden die Biopsien in 4%igem Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphat-gepufferter Natriumlösung (PBS) fixiert.

#### 2.1.3. Einbettung und Herstellung der Semidünnschnitte

Im Institut für Anatomie wurden die Biopsien in Epon, einem Kunstharz, eingebettet. Dies garantierte die dauerhafte Haltbarkeit des Gewebes, um es vor Zersetzungsprozessen zu schützen, die die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Studie beeinträchtigt hätten. Angefertigt wird es nach folgendem Rezept:

Epongemisch:

13g Epon 812

4,9g DDSA Härter

8,9g MNA Härter

0,8g DMP 30 Beschleuniger

*50 ml PBS*

Die Einbettung der Biopsien geht folgendermaßen vonstatten:

*- erster Tag*

1. Abfüllen der Biopsien in 10ml Plastikröhrchen, das Formalin wird verworfen
2. 8 ml PBS auf die Proben hinzugeben, diesen Puffer zweimal wechseln. Danach 24 Stunden bei 4°C kühlstellen

*- zweiter Tag*

3. 50%iges Ethanol (2-4 Stunden)
4. 70%iges Ethanol (24 Stunden bei 4°C)

*- dritter Tag*

5. 90%iges Ethanol (1 Stunde)
6. absolutes Ethanol (2 x 1 Stunde)
7. Propylenoxid (2 Stunden)
8. Epongemisch : Propylenoxid 1 : 4 (1 Stunde)
9. Epongemisch : Propylenoxid 1 : 2 (1 Stunde)
10. Epongemisch : Propylenoxid 1 : 1 (24 Stunden bei 4°C)

*- vierter Tag*

11. Umfüllen der Proben in Plastikröhrchen mit reinem Epongemisch. 1-2 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen, danach Aushärten im Brutschrank (6 Tage bei 65°C)
12. drei Tage stehen lassen bei Raumtemperatur, danach können die Biopsien zur Weiterverarbeitung aus den Plastikröhrchen genommen werden

*- Anfertigen der Semidiinnschnitte:*

Anschließend werden die Harzblöcke mit einem Diamantmesser der Firma Diatome auf dem Ultramicrotom „Ultracut E“ (Fa. Reichert & Jung) in Serienschnitte von 0,5-1µm Dicke geschnitten, die Schnitte werden dann auf Objektträger aufgetrocknet.

Den ersten Schnitt eines Blockes färbt man mit Methylenblau an. Diese Übersichtsfärbung erlaubt eine rasche Orientierung über Art und Verteilung des Gewebes in der Biopsie und ihre Brauchbarkeit für die weiteren immunhistochemischen Untersuchungen.

#### **2.1.4. Antikörper**

Die für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper gegen ARC und FLIP<sub>S</sub> stammen von der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc., USA.

ARC (K-19) ist ein polyklonaler Antikörper, der in Ziegen gewonnen wurde. Antigen ist ein Epitop am Aminoterminal von humanem ARC.

FLIP<sub>S</sub> (F-20) ist ebenfalls ein polyklonaler Antikörper, der in Ziegen gewonnen wurde, und spezifisch an das kürzeste Protein aus der FLIP-Familie, FLIP<sub>S</sub>, bindet. Eine Kreuzreaktion mit FLIP<sub>L</sub> oder Caspasen wurde vom Hersteller ausgeschlossen.

### **2.2. Methoden**

#### **2.2.1. Entharzen**

Die in Epon eingebetteten Schnitte werden durch folgendes Vorgehen entharzt:

1. Methanolisches NaOH für 3 Minuten
2. Methanol-Benzol (1:1) für 3 Minuten
3. 2 x Aceton für jeweils 3 Minuten

Anschließend werden die Schnitte für 10 Minuten in PBS eingestellt.

#### **2.2.2. Immunhistochemie mit anti-ARC und anti-FLIP<sub>S</sub>**

Die Färbungen für ARC und FLIP<sub>S</sub> wurden gleichermaßen wie folgt durchgeführt:

1. primärer Antikörper: ARC (resp. FLIP<sub>S</sub>)-Antikörper 1:200 in PBS, 3% normal rabbit serum → Schnitte werden 24 Stunden bei 4°C inkubiert.
2. Waschen in PBS (2 x 10 Minuten)
3. sekundärer Antikörper: biotinyliertes anti-goat IgG (Vector) 1:200 in PBS → 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
4. Waschen in PBS (2 x 10 Minuten)
5. Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP, Vector) 1:200 in PBS → 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
6. Waschen in PBS (2 x 10 Minuten)

7. Diaminobenzidin (DAB, Sigma) für 12 Minuten
8. Waschen in destilliertem Wasser (10 Minuten)
9. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe (50%iger, 70%iger, 90%iger, 2x absoluter Alkohol) anschließend zweimal Xylol (pro Schritt je 2 Minuten)
10. Eindecken mit Entellan (Merck)

Als Kontrollen werden aus jeder Serie von Folgeschnitten je ein Präparat in dem ersten Schritt statt mit dem primären Antikörper nur mit PBS (3% normal rabbit serum) inkubiert und anschließend nach dem gleichen Protokoll behandelt.

### **2.2.3. TUNEL-Färbung**

Die Färbungen für die DNA-Fragmentierung wurden nach der sogenannten TUNEL (Terminale Transferase-Uridine-Nick-End-Labeling)-Methode durchgeführt. Dabei kommt es zur Markierung freier OH-Enden von DNA-Doppelstrangbrüche, wie sie z.B. in der Apoptose vorkommen, mit 5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU), enzymatisch durch die Terminale Transferase vermittelt. In einem zweiten Schritt kann die Biopsie mit einem Antikörper gegen BrdU inkubiert werden, an welchen wiederum in einem dritten Schritt monoklonales Mäuse-IgG bindet. Letzteres kann über PAP an DAB gekoppelt werden, was lichtoptisch sichtbar ist.

1. 10 Teile Terminale Transferase (TdT, Roche), 20 Teile TdT-Puffer (Boehringer Mannheim), 7,5 Teile  $\text{CoCl}_2$  (Boehringer Mannheim) und 5 Teile 5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrDU) werden in 1000 Teilen PBS verdünnt. Mit dieser Lösung werden die Schnitte 1 Stunde bei 37°C inkubiert.
2. Waschen in PBS (2 x 10 Minuten)
3. 20%iges normal-goat-serum (in PBS verdünnt) → 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. Abziehen der Serumverdünnung mit der Pipette
5. mouse anti-BrDU 1:100 in PBS → 24 Stunden bei 4°C inkubieren
6. Waschen in PBS (2 x 10 Minuten)
7. mouse polyclonal IgG (Sigma) 1:100 in PBS → 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
8. Waschen in PBS (2 x 10 Minuten)

9. mouse peroxidase-antiperoxidase (PAP, Sigma) 1:100 in PBS → 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
10. Waschen in PBS (2 x 10 Minuten)
11. DAB für 12 Minuten
12. Waschen in destilliertem Wasser (10 Minuten)
13. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe (50%iger, 70%iger, 90%iger, 2x absoluter Alkohol) anschließend zweimal Xylol (pro Schritt je 2 Minuten)
14. Eindecken mit Entellan

Zur immunhistologische Kontrollen wird je ein Präparat aus der Serie von Folgeschnitten in dem ersten Schritt mit einer TdT-freien, aber ansonsten gleichartigen Lösung inkubiert und anschließend nach dem gleichen Protokoll behandelt.

#### **2.2.4. Mikroskopische Auswertung**

Die Auswertungen erfolgte an einem Olympus BX50 Phasenkontrastmikroskop.

Zur Betrachtung der Färbungen für DNA-Fragmentierung bzw. des Myofibrillenverlustes wurde eine Fluoreszenzlampe vor das Mikroskop geschaltet. Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, daß Muskelgewebe bei einer Wellenlänge von 440 nm (blau) zu Autofluoreszenz angeregt wird. Dies erleichtert die Betrachtung und Beurteilung der Integrität oder des Ausmaßes der Schädigung der Myofibrillenstruktur. Darüber hinaus treten sowohl gefärbte als auch ungefärbte Zellkerne deutlicher hervor und lassen sich somit leichter erkennen.

Um die Koexpression der Proteine in den einzelnen Zellen bzw. Gewebeabschnitten beurteilen zu können, wurden markante, leicht wiederzufindende Strukturen zur Orientierung gewählt. Dies erlaubte es, auf den Serienschnitten möglichst identische Perspektiven einzustellen und so miteinander vergleichbare Bilder zu gewinnen.

Die Aufnahmen entstanden mit einer Olympus DP10 Digitalkamera und wurden anschließend auf einem herkömmlichen PC begutachtet.

Von jeder Biopsie wurden Übersichtsaufnahmen (200fache Vergrößerung) der Schnitte angefertigt, in denen die Gewebsverteilung der immunhistochemisch dargestellten Proteine untersucht wurde.

Danach wurden die Bilder bei 800facher Vergrößerung zusätzlich auf zellulärem Niveau ausgewertet, Akkumulationen und Aussparungen der verschiedenen untersuchten Proteine innerhalb des Zytoplasmas ließen sich so dokumentieren.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Übersicht

Die immunhistologischen Studien im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden an Semidünnschnitten von in Epon eingebetteten Herzmuskelbiopsien durchgeführt. Um die Qualität des Gewebes im Vorfeld der Experimente zu beurteilen, wurde der erste Schnitt jeder Biopsie mit Methylblau angefärbt (Abb. 3). Anhand dieser Übersicht konnte man zum einen beurteilen, ob das Gewebe gut erhalten und zum anderen, ob der Anschnitt für die Studie geeignet war. Wenn sich in der Durchsicht zu viel Fett- und Bindegewebe bzw. zu wenige Muskelzellen fanden, wurde die Biopsie an einer anderen Stelle neu angeschnitten oder, bei wiederholt unbrauchbaren Präparaten, aus der Studie genommen, so daß am Ende von den ursprünglich zwölf Patienten neun in die Studie aufgenommen wurden.

Anhand der Methylblaufärbung lassen sich bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium bereits die typischen histologischen Kriterien der DCM, wie langgestreckte, verschmälerte Zellen, erkennen. Außerdem stechen die Kerne der Kardiomyozyten als dunkel violette, intrazellulär gelegene Strukturen hervor.

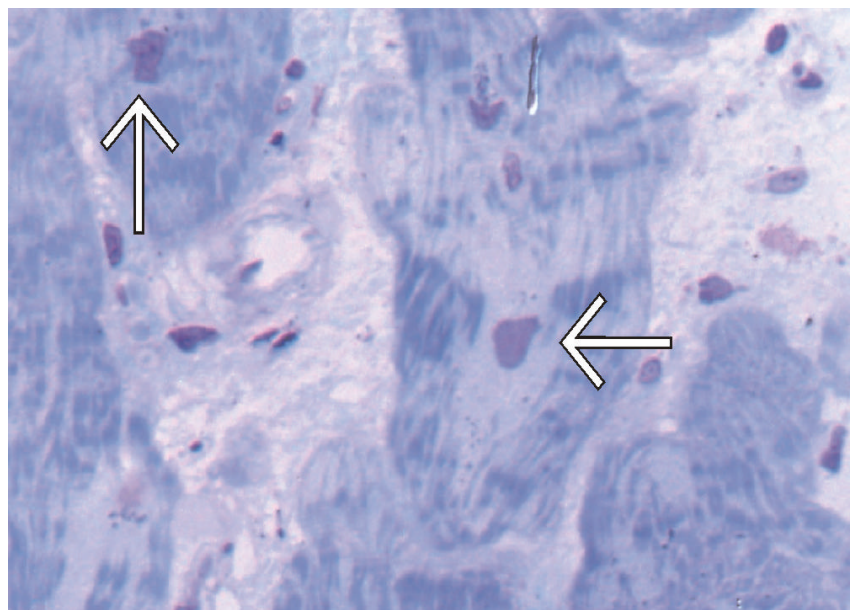


Abb. 3: Herzmuskelzellen (Methylblau). Man erkennt deutlich die blau-gefärbte Zelle mit dem mittelständigen Zellkern (Pfeile).

#### 3.2. Autofluoreszenzverlust und TUNEL-Färbung

Im Fluoreszenzmikroskop erscheinen die Herzmuskelzellen inhomogen gelblich-grün. Die einzelnen Myozyten lassen sich meist gut voneinander unterscheiden, das dazwischenliegende Bindegewebe tritt dunkel in den Hintergrund. Myofibrillen zeigen besonders starke Autofluoreszenz. Das Erscheinungsbild der Zellkörper variiert erheblich: Ein Teil der Biopsien weist

überwiegend stark leuchtende Zelleiber auf. (Abb. 4) Autofluoreszenzminderungen finden sich dort lediglich unmittelbar perinukleär.

Andere Zellen präsentieren sich deutlich dunkler (Abb. 5), teilweise sind statt eines massiven Zytoplasmas nur einzelne Fäden zu erkennen, zwischen denen keine weitere Struktur hervortritt. Dadurch entsteht ein auffälliges Streifenmuster (Abb. 6)

In der Betrachtung der TUNEL-Färbungen unter Autofluoreszenzlicht fallen Zellkerne, in denen

DNA-Fragmente vorkommen, durch den an sie gebundenen Farbstoff leuchtend rot hervor (Abb. 7B und C). Sie erscheinen dabei weitestgehend homogen gefärbt, lediglich in der Mitte des Kernes kann die Intensität etwas geringer ausfallen. Nuclei, in denen keine DNA-Fragmentierung stattfand, präsentieren sich dunkelgrün bis grau und sind vom umgebenden Zytoplasma oft nicht leicht abzugrenzen (Abb. 7A). Um die eindeutige Zuordnung einer Struktur zum Zellkern zu erleichtern, wurde der entsprechende Abschnitt im Methylenblau-

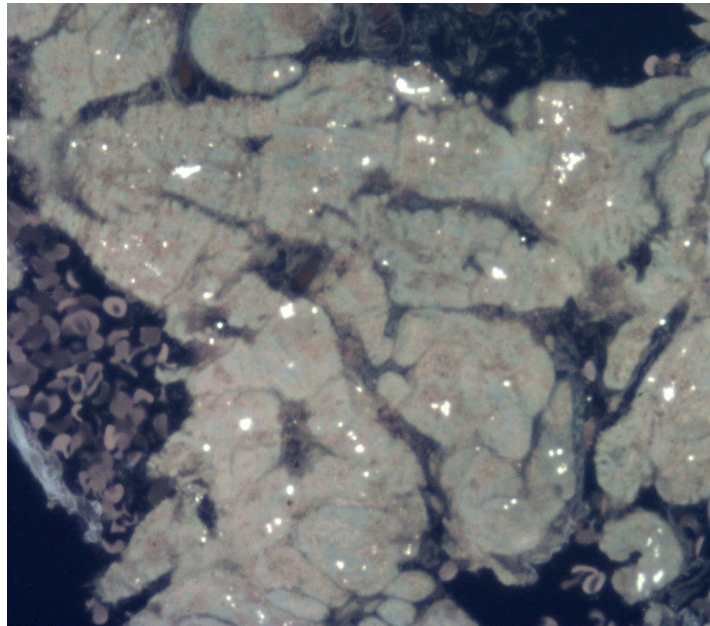


Abb. 4: Übersichtsaufnahme unter Autofluoreszenz. Das hier dargestellte Gewebe zeigt eine unverminderte Eigenleuchtkraft. Zellkerne sind nicht zu sehen, die Lysosomen treten hellweiß hervor.

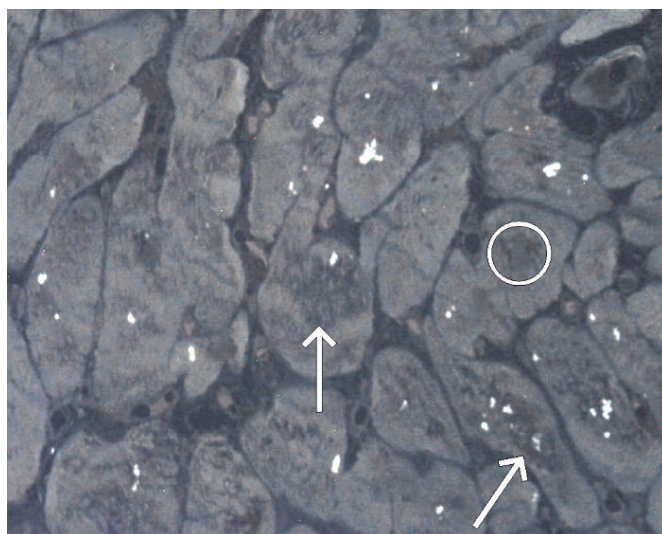


Abb. 5: Man erkennt Zellen mit leichter bis mäßiger AF-Abschwächung (Pfeile). In einer Zelle mit unverminderter AF findet sich ein nicht-fragmentierter Zellkern (Kreis)

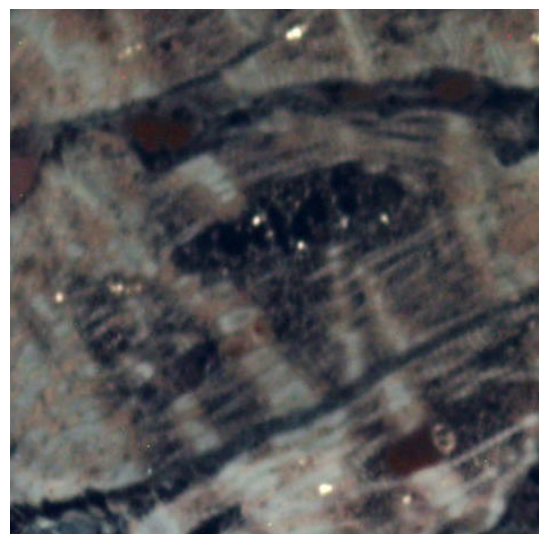


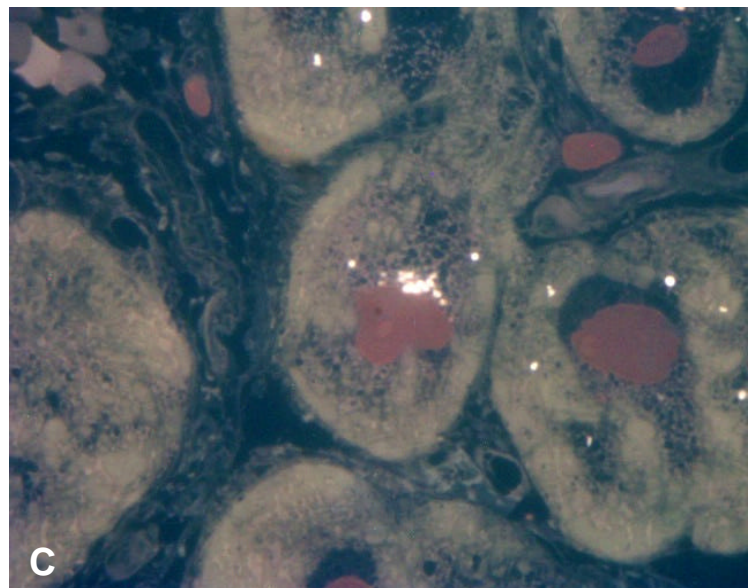
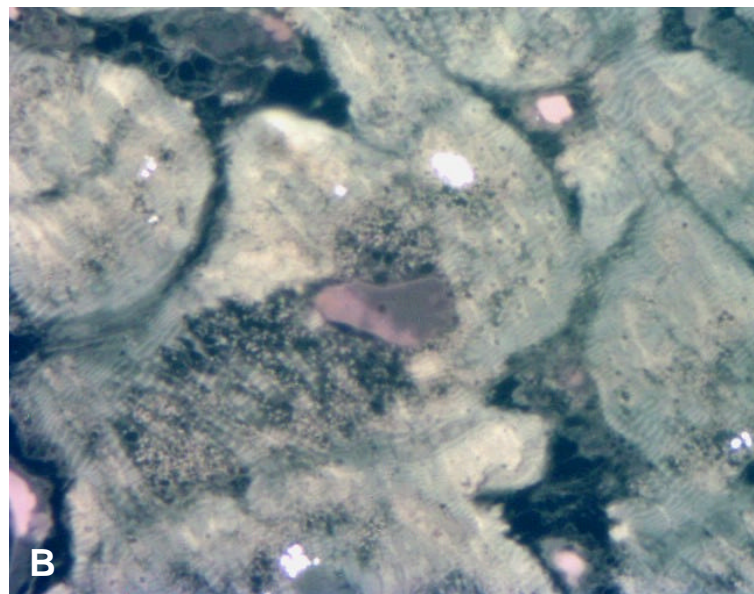
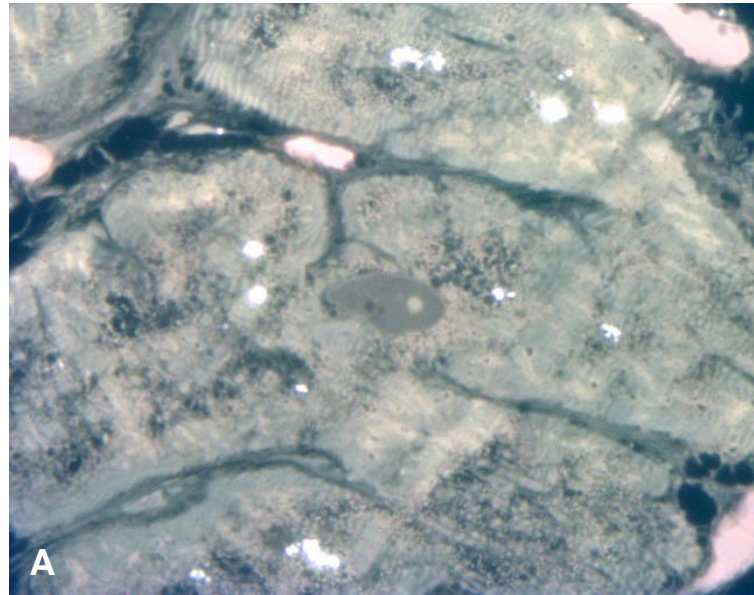
Abb. 6: Kardiomyozyt mit starker AF-Minderung. Die an sich dunkle Zelle wird von trabekelartigen Strukturen mit deutlicherer Autofluoreszenz durchzogen.



gefärbten Folgeschnitt untersucht, da dort alle Zellkerne gleichermaßen stark hervortreten.

Im Ergebnis sind die Biopsien im einzelnen betrachtet nicht einheitlich. So fanden sich in einer einzigen Probe sowohl große, flächige Bereiche, in denen die Autofluoreszenz erheblich vermindert war als auch Abschnitte mit starker Eigenleuchtkraft. Es läßt sich jedoch insofern eine Häufung beobachten, als daß sich in den Kernen jener Zellen, in welchen die zytoplasmatische Autofluoreszenz geschwächt erscheint, meist Zeichen der DNA-Fragmentierung zeigen (Abb. 8(A)). Es kommen zwar ebenso rote Kerne in uneingeschränkt leuchtenden Zellen als auch unauffällige Nuclei in stark fluoreszenzgeminderten Myozyten vor, jedoch nicht in einer vergleichbaren Häufigkeit. (Abb. 8(B) und (C))

Abb. 7: (A) Kern ohne DNA-Fragmentierung. Der Nukleus erscheint grün-grau, mit einem deutlich hervortretenden Nukleolus. (B) Kern mit teilweiser DNA-Fragmentierung. Ein leichter roter Saum umgibt auch die Bereiche ohne signifikante DNA-Fragmentierung. (C) Kerne mit starker DNA-Fragmentierung. Sie stehen im Bild dunkelrot hervor.



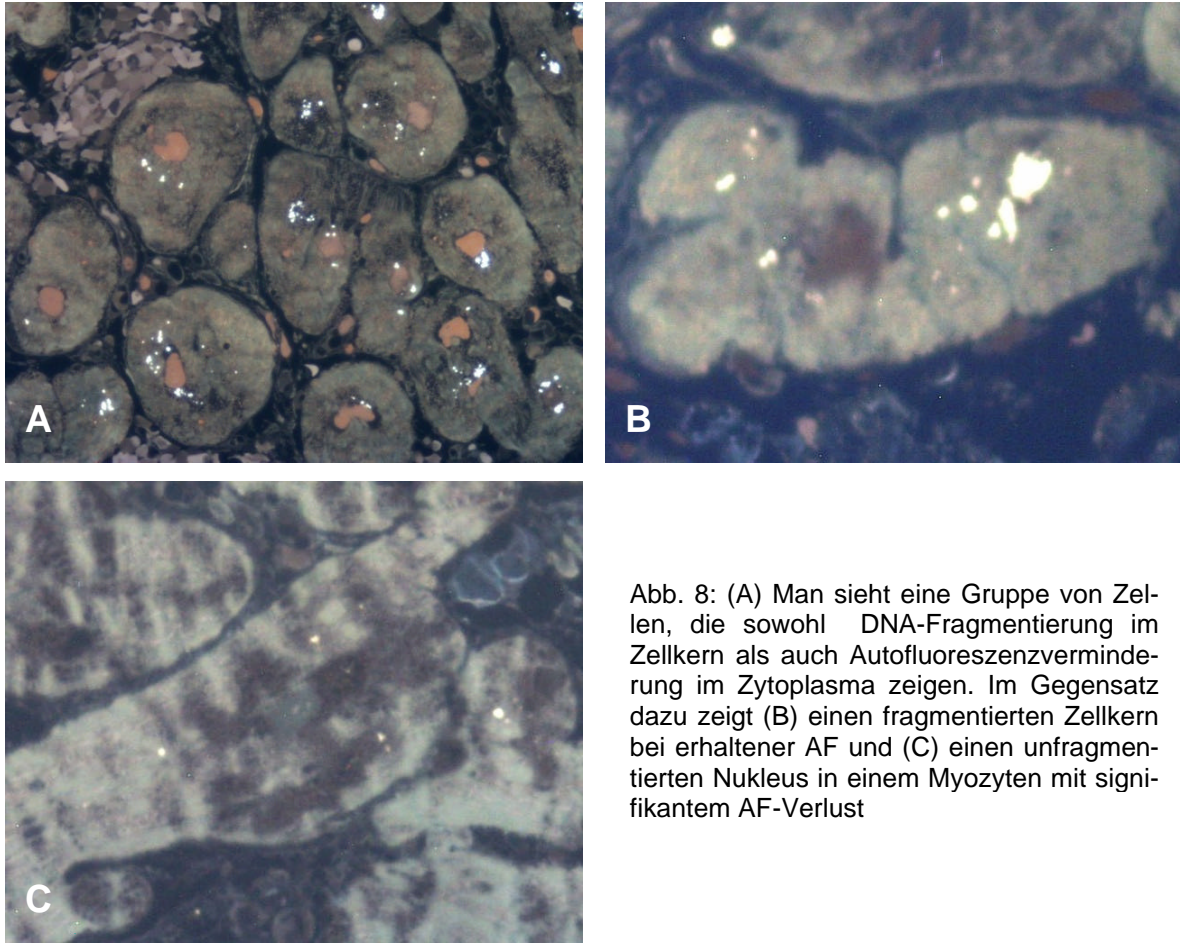


Abb. 8: (A) Man sieht eine Gruppe von Zellen, die sowohl DNA-Fragmentierung im Zellkern als auch Autofluoreszenzverminderung im Zytoplasma zeigen. Im Gegensatz dazu zeigt (B) einen fragmentierten Zellkern bei erhaltener AF und (C) einen unfragmentierten Nukleus in einem Myozyten mit signifikantem AF-Verlust

### 3.3 ARC

Mit dem verwendeten Antikörper (Santa Cruz) konnte ARC in unterschiedlicher Ausprägung in allen Biopsien nachgewiesen werden. Mittels Phasenkontrastverschiebung läßt sich der lichtoptische Bereich einstellen, in welchem sich die Unterschiede am deutlichsten hervorheben.

Das interzelluläre Bindegewebe bleibt ungefärbt, es finden sich aber vereinzelte Erythrozyten, die eine Mehranreicherung des Farbstoffs zeigen (Abb.9).

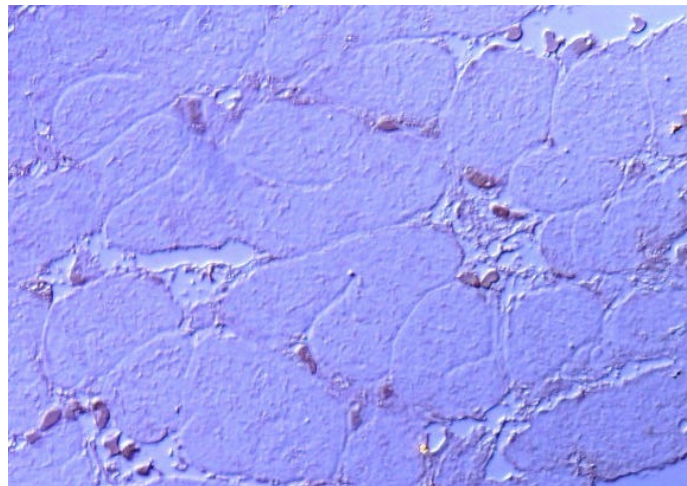


Abb 9: Herzmuskelzellen, in denen ARC nicht nachzuweisen war. Wegen der Phasenkontrastverschiebung erscheint das an sich braun gefärbte Gewebe hier bläulich.



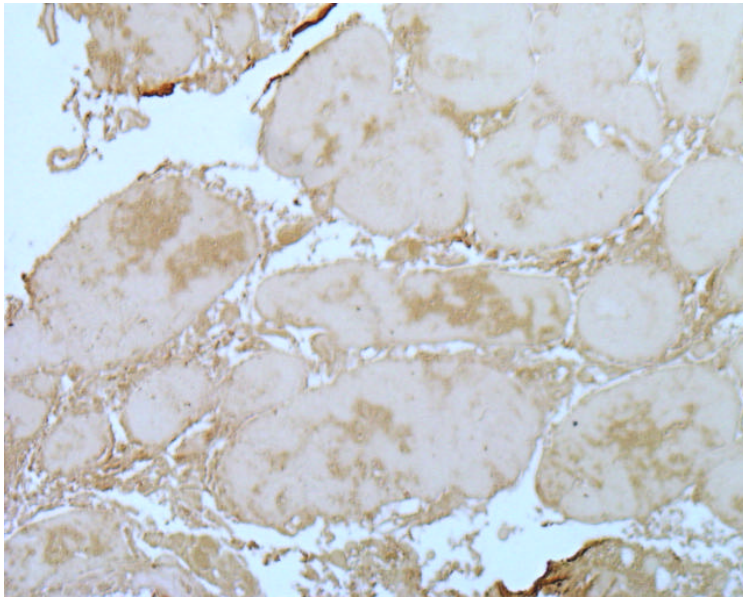
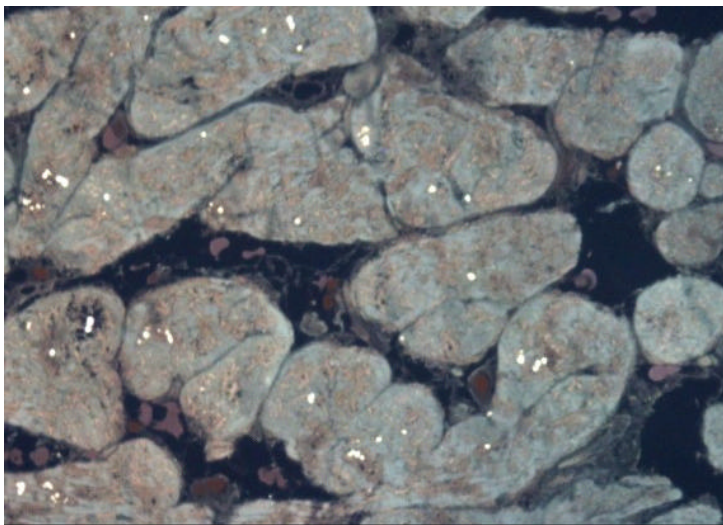


Abb. 10: Herzmuskelzellen, die z.T. starke Anreicherungen an ARC zeigen, erkennbar an den dunklen Arealen. Außerhalb dieser Bereiche erscheint das Zytoplasma weitestgehend homogen.

Man erkennt im Schnitt die Herzmuskelzellen, von denen viele Anreicherungen von Anti-ARC aufwiesen. Typischerweise findet es sich in Form hervorstechender Akkumulate,

wohingegen das restliche Zytoplasma relativ homogen und hell erscheint.

Es finden sich Areale, in denen ARC bevorzugt angereichert wird. Dies sind v.a. zytosolische Abschnitte unmittelbar perinukleär (Abb. 10). Bereiche mit starker Akkumulation von ARC



erscheinen durch viele kleinere, nicht gefärbte Einstreuungen granulär.

Im Zellkern läßt sich ARC immunhistochemisch nicht nachweisen. Jedoch kommt es durch die starke Anfärbbarkeit des unmittelbar um den Kern gelegenen Zytoplasmas in manchen Fällen dazu, daß sich der Kern als helle Aussparung gegenüber der ihn umgebenden dunkleren Zellsubstanz hervorhebt (Abb. 12).

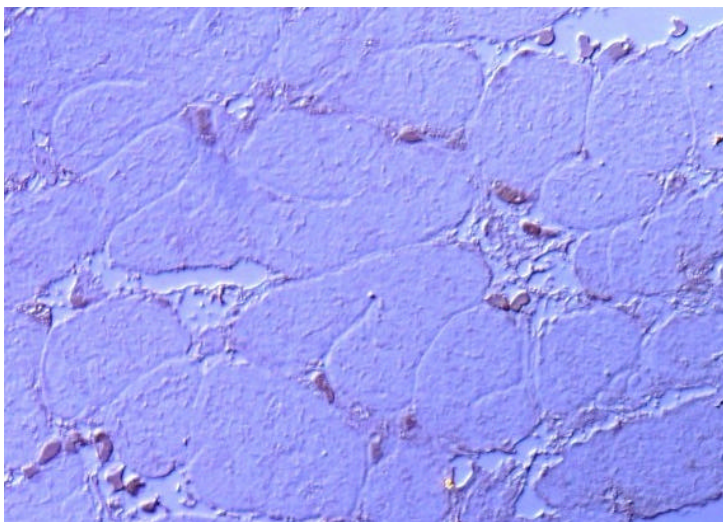


Abb. 11: Der Schnitt aus Abb. 9 im Vergleich mit der TUNEL-Färbung an der selben Biopsie. Die Zellen zeigen eine unverminderte Autofluoreszenz, jedoch keine signifikante Expression von ARC

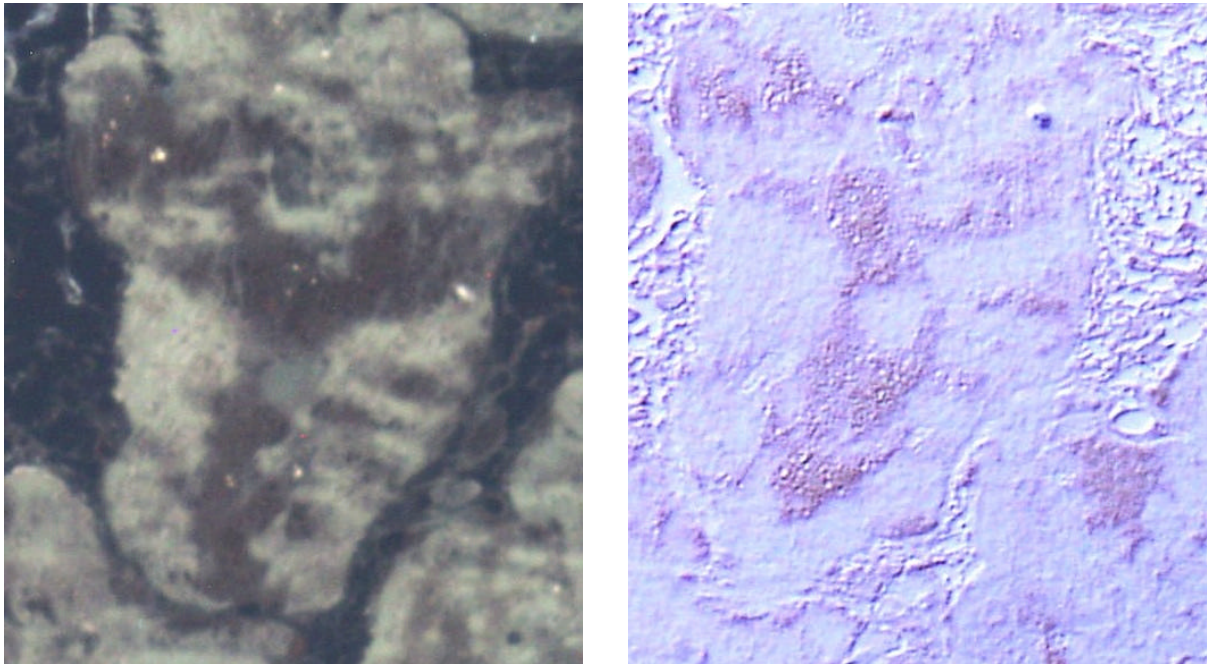


Abb. 12: Kardiomyozyt, der in der linken Bild mit dem TUNEL-Verfahren und im rechten mit ARC-Antikörper immunhistochemisch behandelt wurde. Man erkennt den Autofluoreszenzverlust, der dunkel das Zytoplasma durchzieht. Im Vergleich sieht man ARC-Anreicherungen in den gleichen Abschnitten des Zellkörpers. Der (unfragmentierte) Zellkern, den man im links als kleine türkis-grüne Struktur wahrnimmt, läßt sich im rechts als Aussparung in dem ARC-Akkumulat erahnen.

Der Vergleich mit den mit der TUNEL-Methode angefärbten und unter Autofluoreszenz betrachteten Folgeschnitten zeigt eine auffällige Übereinstimmung der Bereiche verminderter Leuchtkraft mit den Arealen signifikanter ARC-Anreicherung. Zwar gibt es u.a. Zellen, die eine deutliche Schwäche der Autofluoreszenz zeigen und dabei keinen erhöhten Gehalt an ARC, umgekehrt konnten aber keine Zellen mit starker Anreicherung des Proteins gefunden werden, bei denen nicht auch die Eigenleuchtkraft herabgesetzt gewesen wäre. Die Abschnitte erniedrigter Autofluoreszenz erscheinen überwiegend großflächiger als die in den Folgeschnitten an gleicher Stelle gefundenen Bereiche erhöhter Anreicherung mit ARC.

Ein Zusammenhang zwischen den Zellkernen mit nachweisbarer DNA-Fragmentierung und der Expression von ARC konnte nicht beobachtet werden. So finden sich Zellen mit stark fragmentierten Nucleus, die jedoch keine signifikante Akkumulation von ARC zeigten. Ebenso gibt es Myozyten mit unscheinbarem Kern, die im Folgeschnitt aber eine starke Anreicherung des Proteins zeigten. In diesen Zellen findet sich dann auch ein mindestens leicht ausgeprägter Autofluoreszenzverlust.

In allen beobachteten und hier geschilderten Befunden gleichen die Kontrollgewebe den Biopsien der DCM-Patienten.



### 3.4. FLIP<sub>S</sub>

Es war mit den von der Firma Santa Cruz verwendeten Anti-FLIP<sub>S</sub>-Antikörpern möglich, in den Herzmuskelbiopsien Anreicherungen dieses Proteins färbereich zur Darstellung zu bringen. Die Phasenkontrastmikroskopie erlaubte eine stärkere Hervorhebung der positiv reagierenden Areale.

Die Herzmuskelzellen sind deutlich zu erkennen. In allen Biopsien läßt sich FLIP<sub>S</sub> nachweisen, die Verteilung innerhalb einer Probe variiert zum Teil aber erheblich. So finden sich Bereiche mit ausgesprochen starker Anreicherung, wohingegen andere Zellen völlig frei von

FLIP<sub>S</sub> erscheinen.

FLIP<sub>S</sub> zeigt sich als rein zytosolisches Protein. In den Myozyten, in denen es exprimiert wird, findet es sich v.a. in größeren, vom restlichen Zytoplasma meist deutlich abgrenzbaren Feldern. Aber auch der restliche Zelleib erscheint eher inhomogen, was auf eine diffusere Verteilung im Kardiomyozyten hinweist. In der FLIP<sub>S</sub>-Färbung fällt eine stärkere Betonung der Zellmembran auf, was für eine gewisse Anreicherung unmittelbar unterhalb der Laminae spricht.

Der Zellkern läßt sich mit dieser Methode genauso wenig darstellen, wie zuvor mit ARC. Er hebt sich aber gerade dadurch in den FLIP<sub>S</sub>-exprimierenden Muskelzellen von dem ihm umgebenden, gut anfärbbaren, Zytosol ab.

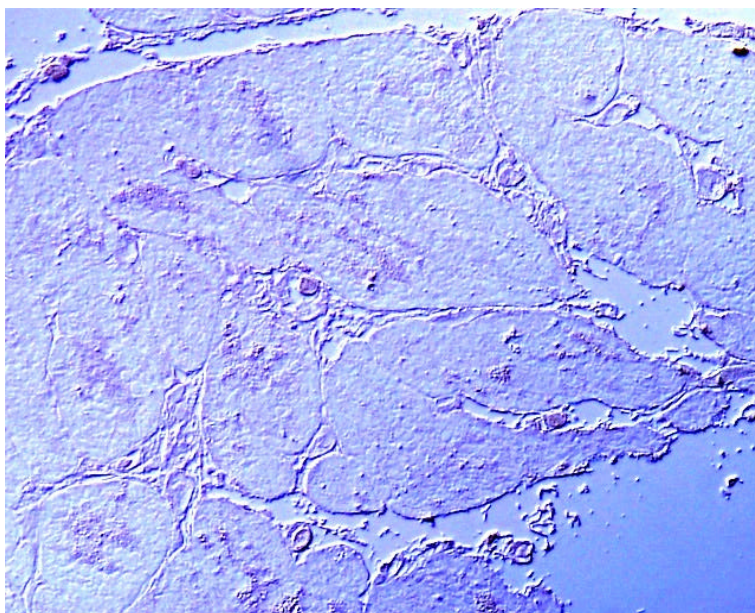
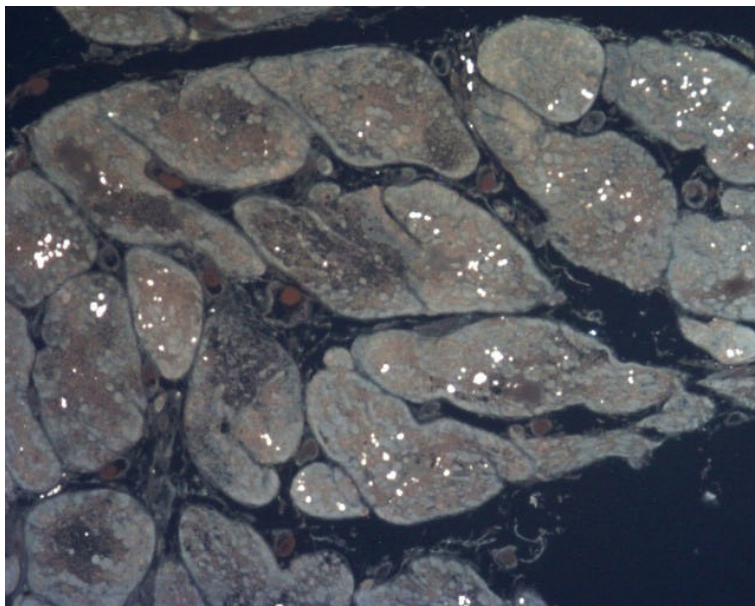


Abb. 13: Die selben Herzmuskelzellen unter der Autofluoreszenzlampe nach TUNEL-Färbung (oben) und bei Nachweis von FLIP<sub>S</sub> (unten). Größere Anreicherungen von FLIP<sub>S</sub> finden sich v.a. dort, wo die AF stark vermindert ist

Vergleicht man die immunhistochemischen Färbungen mit dem FLIP<sub>S</sub>-Antikörper mit jenen Schnitten der jeweils gleichen Biopsie, die mit der TUNEL-Methode behandelt wurden (Abb. 13), so kann man folgende Beobachtung machen: Die Zellen zeigen vor allem dort, wo die Autofluoreszenz vermindert ist, starke Anreicherungen von FLIP<sub>S</sub>. Zwar sind die Areale verminderter Leuchtkraft i.d.R. größer, decken sich aber in ihrer Lokalisation weitgehend mit denen der vermehrten FLIP<sub>S</sub>-Akkumulation. Darüber hinaus lassen sich allerdings auch einige Bereiche erhöhter FLIP<sub>S</sub>-Konzentration finden, die in der TUNEL-Färbung kein Korrelat besitzen.

Ein Zusammenhang zwischen DNA-Fragmentierung und FLIP<sub>S</sub>-Expression läßt sich nicht feststellen. So kann man Zellen mit stark fragmentierten Zellkern, jedoch ohne Mehranreicherung von FLIP<sub>S</sub> beobachten und auf der anderen Seite genauso Zellen mit deutlich erhöhter FLIP<sub>S</sub>-Konzentration im Zytoplasma, jedoch ohne signifikante Erhöhung der DNA-Fragmente im Nucleus. Wenn DNA-Fragmentierung und signifikante FLIP<sub>S</sub>-Akkumulierung gleichzeitig vorliegen, so findet sich i.d.R. auch eine mindestens leichte Verminderung der Autofluoreszenz.

Die vergleichende Beurteilung der FLIP<sub>S</sub>- und ARC-Färbungen zeigt, daß diese überwiegend in denselben Zellen an gleicher Stelle vorkommen (Abb. 14). Dabei ist ARC jedoch weniger

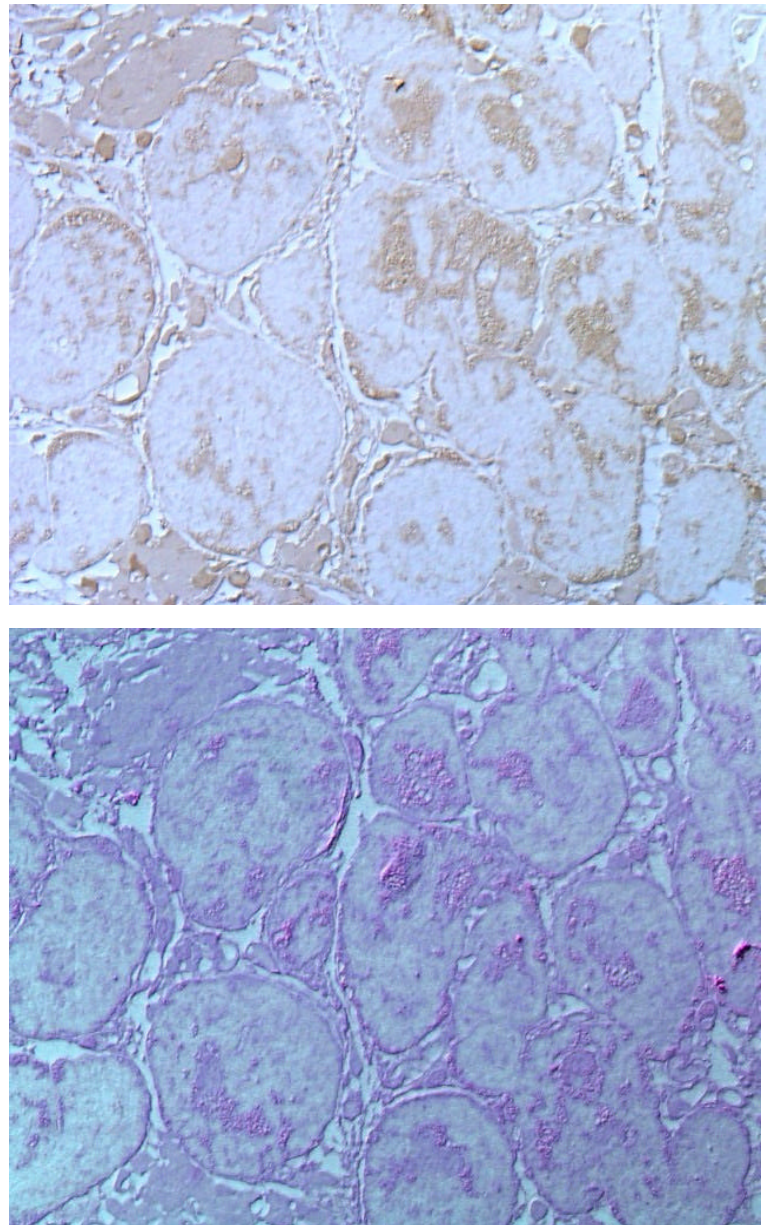


Abb. 14: Herzmuskelzellen nach ARC- (oben) und FLIP<sub>S</sub>-Färbung (unten). Neben der relativ stärkeren Expression von FLIP<sub>S</sub> in diesem Beispiel fällt die Betonung der Zellränder nach immunhistochemischen Nachweis von FLIP<sub>S</sub> ins Auge



diffus über das gesamte Zytoplasma verteilt, sondern findet sich hauptsächlich in Form von größeren Akkumulaten, wohingegen die FLIP<sub>S</sub>-Immunohistochemie neben diesen Bereichen starker Anreicherungen auch den restlichen Zelleib inhomogen anfärbt. Darüber hinaus sieht man bei ARC-Verteilung keine vergleichbare Betonung der Zellmembran, wie man sie bei FLIP<sub>S</sub> beobachten kann.

Es lassen sich zwar sowohl Myozyten mit starker ARC- und nur geringfügiger FLIP<sub>S</sub>-Expression als auch umgekehrt finden, die überwiegende Zahl der Zellen, die eines der beiden anreichtert zeigt allerdings auch eine Akkumulation des anderen Proteins. Ob ein Kardiomyozyt nun stärker

ARC oder FLIP<sub>S</sub> oder beide in vergleichbarer Masse anreichert, läßt sich mit keinen anderen morphologischen Beobachtung in Verbindung bringen.

Auch das Kontrollgewebe zeigte eine diffuse Anfärbbarkeit für FLIP<sub>S</sub> und war damit den Biopsien der DCM-Patienten vergleichbar.

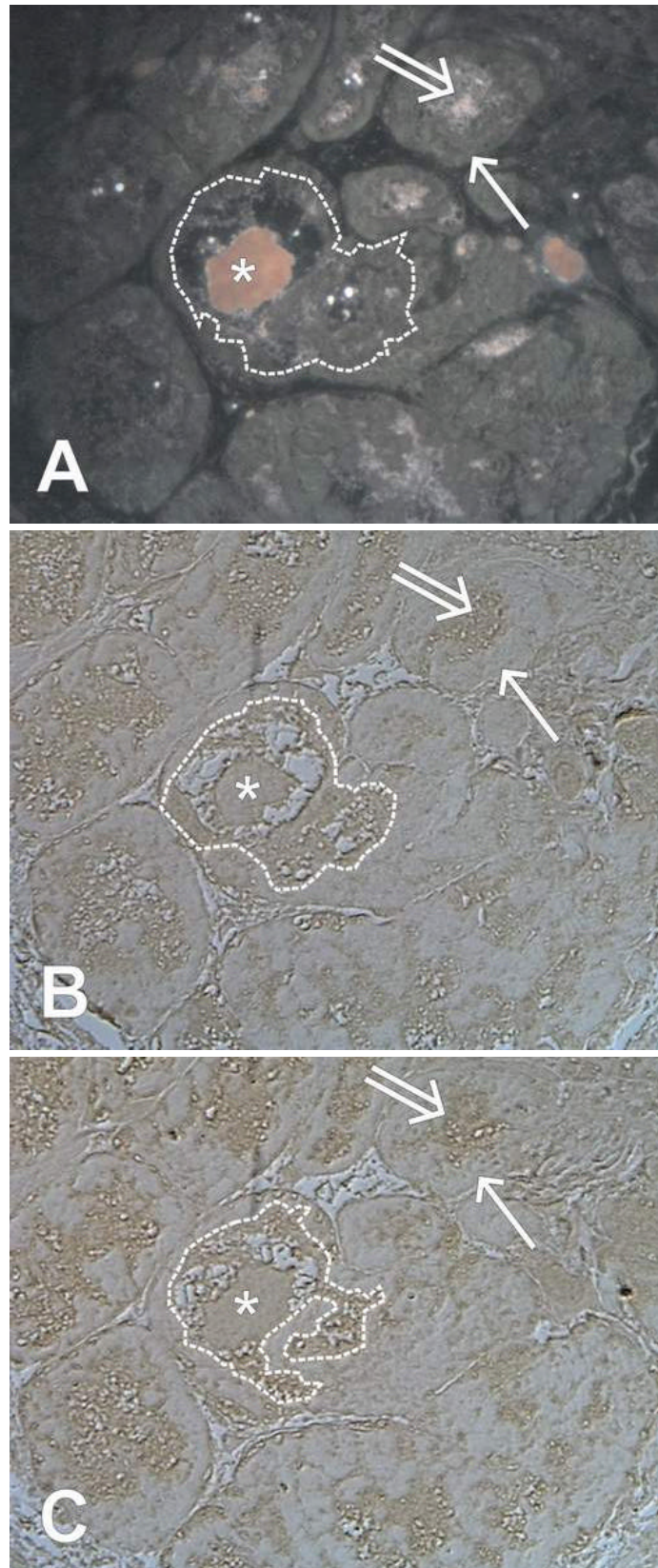


Abb. 15: zueinandergehörige Serienschritte nach TUNEL-Färbung unter Autofluoreszenzlicht (A), FLIP<sub>S</sub>- (B) und ARC- (C) Immunhistochemie.

Der hypertrophe Zellkern einer stark deformierten Zelle wurde mit \* gekennzeichnet, er ist stark TUNEL-positiv. Zur Verdeutlichung wurde autofluoreszenzvermindertes perinukleäres Zytoplasma mit einer gestrichelten Linie eingerahmt; dasselbe Muster findet sich in B und C wieder.

Die Pfeile zeigen nochmals eindringlich, daß die Autofluoreszenzminderung und die Akkumulation der Proteine im zentralen Zytoplasma stärker sind (Doppelpfeil), was sich nicht in gleicher Weise im randständigen Zelleib findet (einfacher Pfeil). [Abbildung publiziert in Ott et al. 2002]



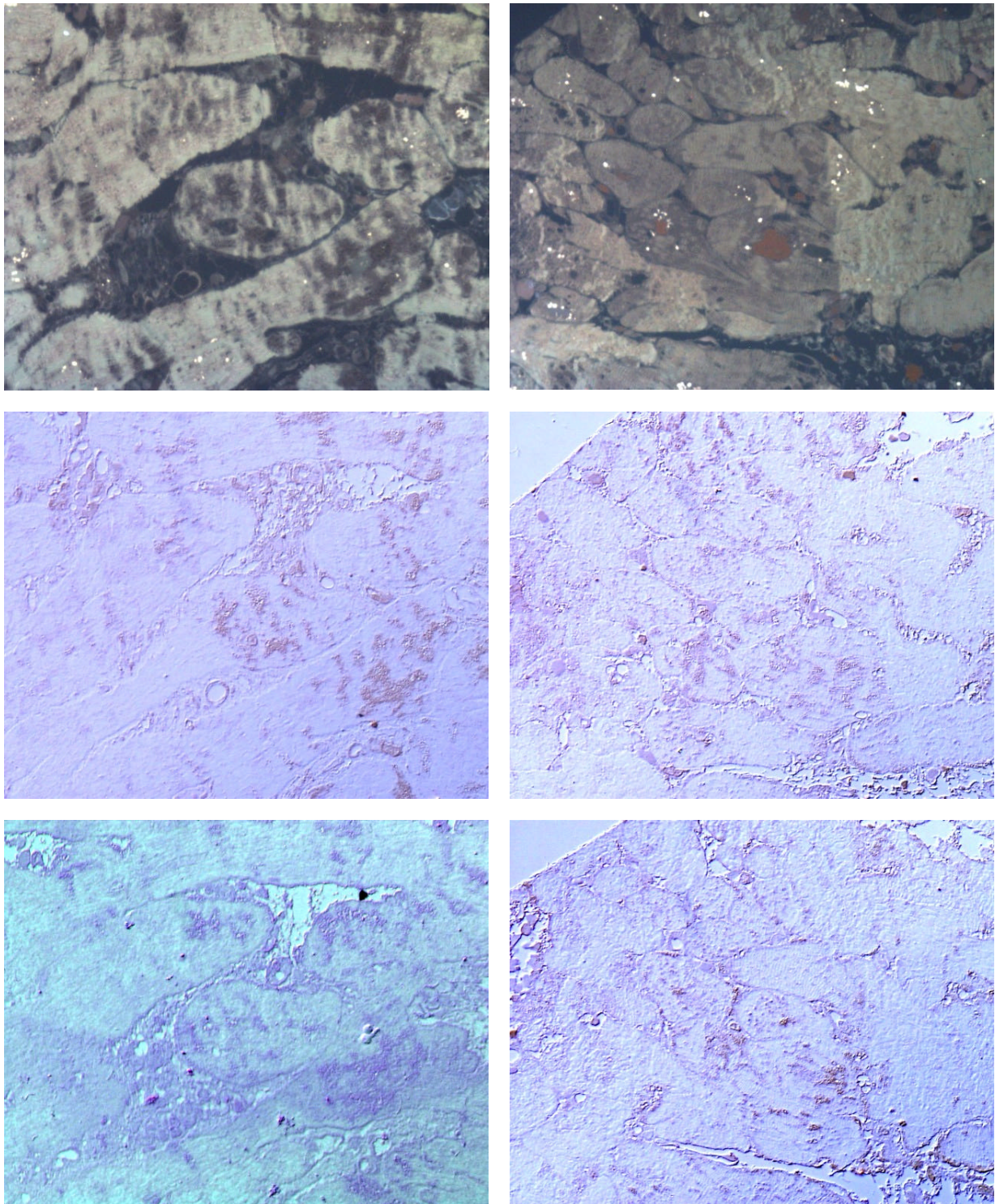


Abb. 16: Jeweils drei zueinander gehörende Serienschnitte untereinander, wobei oben die TUNEL-Färbung, in der Mitte ARC und unten FLIP<sub>s</sub> zur Darstellung kommt. Links sieht man wiederum die Akkumulation von ARC und FLIP<sub>s</sub> in den Bereichen erniedrigter Autofluoreszenz, wobei hier FLIP<sub>s</sub> stärker anfärbbar erscheint. In der rechten Spalte kommt ARC geringfügig deutlicher zur Darstellung. Man beachte den unvermittelten Übergang von intakter Autofluoreszenz zu verminderter Eigenleuchtkraft. Entsprechend sind FLIP<sub>s</sub> und ARC in den Zellen der linken zwei Drittel des Bildes, jedoch praktisch nicht im rechten Drittel nachweisbar.

### 3.5 Immunhistochemische Kontrollen

In den Kontrollfärbungen, die ohne den primären Antikörper angefertigt wurden, läßt sich keine immunhistochemische Reaktion nachweisen. Die Kardiomyozten sind durchsichtig, nur mit Hilfe des Phasenkontrastfilters lassen sich die Umrisse der Zellen erkennen. Damit ist eine direkte Reaktion des in der Studie hergenommenen Herzgewebes mit einem der Reagenzien der nachfolgenden Versuchsanordnung ausgeschlossen.

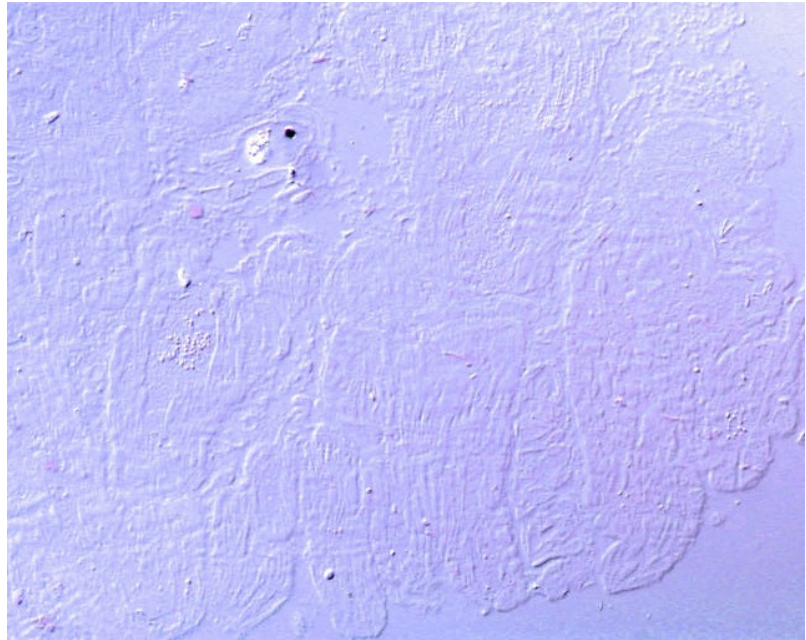


Abb. 17: Immunhistochemische Kontrolle

### 3.6. Tabellarische Auswertung

Die Einzelaufnahmen wurden ausgezählt mit Hinblick darauf, wie viele Zellen mit „intakter Autofluoreszenz“, „leichtem Autofluoreszenzverlust“, „mäßigem Autofluoreszenzverlust“ und „starkem Autofluoreszenzverlust“ sich in einem Gewebsabschnitt finden ließen.

Als „intakte Autofluoreszenz“ wurden jene Zellen gewertet, in denen keine dunklen Stellen unter der AF-Lampe beobachtet wurden. Zellen, die vereinzelte punktförmige Autofluoreszenzverluste zeigten, galten als „leicht“, solche die eine dezent dunklere Grundstruktur oder konfluierende tieferdunkle Flecken zeigten, als „mäßig“ und jene, die größere dunkle Bereiche (mehr als etwa ein Drittel des sichtbaren Zytoplasmas) aufwiesen, wurden als „stark“ autofluoreszenzvermindert eingestuft.

Entsprechend wurde bei den ARC- und FLIP<sub>S</sub>-Färbungen vorgegangen, wobei zwischen lichtmikroskopisch „ARC-(FLIP<sub>S</sub>)-freien Zellen“, „Zellen mit geringer ARC-(FLIP<sub>S</sub>)-



Anfärbung“, „Zellen mit mäßiger ARC-(FLIP<sub>S</sub>-)-Anfärbung“ und „Zellen mit starker ARC-(FLIP<sub>S</sub>-)-Anfärbung“ unterschieden wurde.

Diese Methode ist semiquantitativ und kann für sich keinen Anspruch auf absolute Exaktheit erheben, läßt jedoch Trends erkennen.

Um die verschiedenen Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, dienen die Indizes. Zur Errechnung dieser Indizes wird den Zellen ohne Autofluoreszenzverlust (AfV) der Wert 0 zugewiesen, den Zellen mit leichtem AfV der Wert 1, mit mäßigem AfV der Wert 2 und mit starkem AfV der Wert 3. Die sich ergebende Zahl wird durch die Anzahl der insgesamt begutachteten Zellen geteilt. Das gleiche gilt in der Folge für ARC und FLIP<sub>S</sub>, so daß sich folgende Formeln ergeben:

$$\text{AfV-Index} = \frac{n_1(\text{leichter AfV}) + [n_2(\text{mäßiger AfV}) \times 2] + [n_3(\text{starker AfV}) \times 3]}{n_0(\text{Gesamtzahl der Zellen})}$$

$$\text{ARC-Index} = \frac{n_1(\text{leichtes ARC}) + [n_2(\text{mäßiges ARC}) \times 2] + [n_3(\text{starkes ARC}) \times 3]}{n_0(\text{Gesamtzahl der Zellen})}$$

$$\text{FLIP}_S\text{-Index} = \frac{n_1(\text{leichtes FLIP}_S) + [n_2(\text{mäßiges FLIP}_S) \times 2] + [n_3(\text{starkes FLIP}_S) \times 3]}{n_0(\text{Gesamtzahl der Zellen})}$$

Somit ließen sich Werte erzielen, die den jeweiligen Gewebsabschnitt charakterisieren, und dies unabhängig von der absoluten Zahl der ausgezählten Zellen, die von Biopsie zu Biopsie sehr unterschiedlich ausgefallen ist.

**Auswertung des Autofluoreszenzverlustes**

Biopsie	Alter	Abschnitt	Angeschnittene Zellen	Zellen mit intakter Af	rel. Anteil	leichtem AfV	rel. Anteil	mäßigem AfV	rel. Anteil	starkem AfV	rel. Anteil	AfV-Index
99	42	A	34	27	79,4%	6	17,6%	1	2,9%	0	0,0%	0,31
		B	25	21	84,0%	1	4,0%	3	12,0%	0	0,0%	
		gesamt	59	48	81,4%	7	11,9%	4	6,8%	0	0,0%	
100	62	A	23	10	43,5%	0	0,0%	12	52,2%	1	4,3%	2,36
		B	24	12	50,0%	3	12,5%	5	20,8%	4	16,7%	
		gesamt	47	22	46,8%	3	6,4%	17	36,2%	5	10,6%	
102	52	A	15	3	20,0%	6	40,0%	5	33,3%	1	6,7%	6,63
		B	18	5	27,8%	1	5,6%	3	16,7%	9	50,0%	
		gesamt	33	8	24,2%	7	21,2%	8	24,2%	10	30,3%	
103	48	A	18	7	38,9%	5	27,8%	4	22,2%	2	11,1%	6,00
		B	11	0	0,0%	3	27,3%	4	36,4%	4	36,4%	
		gesamt	29	7	24,1%	8	27,6%	8	27,6%	6	20,7%	
105	42	A	16	9	56,3%	3	18,8%	3	18,8%	1	6,3%	1,33
		B	14	9	64,3%	1	7,1%	1	7,1%	3	21,4%	
		gesamt	30	18	60,0%	4	13,3%	4	13,3%	4	13,3%	
113	52	A	15	6	40,0%	2	13,3%	4	26,7%	3	20,0%	5,83
		B	33	6	18,2%	10	30,3%	10	30,3%	7	21,2%	
		gesamt	48	12	25,0%	12	25,0%	14	29,2%	10	20,8%	
114	54	A	12	0	0,0%	3	25,0%	2	16,7%	7	58,3%	2,92
		B	19	12	63,2%	7	36,8%	0	0,0%	0	0,0%	
		gesamt	31	12	38,7%	10	32,3%	2	6,5%	7	22,6%	
115	62	A	38	16	42,1%	2	5,3%	7	18,4%	13	34,2%	2,83
		B	26	14	53,8%	1	3,8%	4	15,4%	7	26,9%	
		gesamt	64	30	46,9%	3	4,7%	11	17,2%	20	31,3%	
119	55	A	21	16	76,2%	2	9,5%	2	9,5%	1	4,8%	1,39
		B	10	2	20,0%	3	30,0%	2	20,0%	3	30,0%	
		gesamt	31	18	58,1%	5	16,1%	4	12,9%	4	12,9%	

### Auswertung der ARC-Färbungen

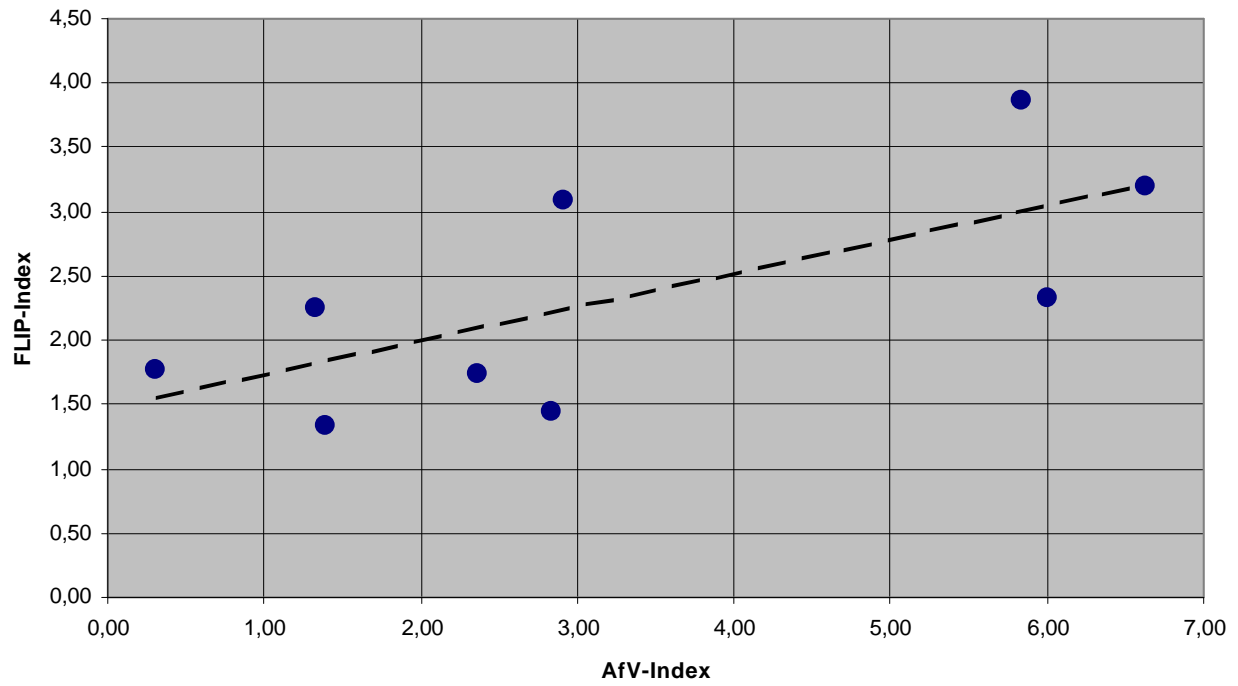
Biopsie	Alter	Abschnitt	Angeschnittene Zellen	ARC-freie Zellen	Anteil	mit leichtem ARC	Anteil	mäßigem ARC	Anteil	starkem ARC	Anteil	ARC-Index
99	42	A	34	15	44,1%	16	47,1%	3	8,8%	0	0,0%	0,39
		B	25	24	96,0%	1	4,0%	0	0,0%	0	0,0%	
		gesamt	59	39	66,1%	17	28,8%	3	5,1%	0	0,0%	
100	62	A	23	11	47,8%	9	39,1%	1	4,3%	2	8,7%	0,64
		B	24	16	66,7%	5	20,8%	1	4,2%	2	8,3%	
		gesamt	47	27	57,4%	14	29,8%	2	4,3%	4	8,5%	
102	52	A	15	5	33,3%	4	26,7%	4	26,7%	2	13,3%	1,39
		B	18	1	5,6%	9	50,0%	5	27,8%	3	16,7%	
		gesamt	33	6	18,2%	13	39,4%	9	27,3%	5	15,2%	
103	48	A	18	4	22,2%	4	22,2%	7	38,9%	3	16,7%	1,38
		B	11	3	27,3%	4	36,4%	3	27,3%	1	9,1%	
		gesamt	29	7	24,1%	8	27,6%	10	34,5%	4	13,8%	
105	42	A	16	8	50,0%	5	31,3%	2	12,5%	1	6,3%	0,97
		B	14	4	28,6%	5	35,7%	3	21,4%	2	14,3%	
		gesamt	30	12	40,0%	10	33,3%	5	16,7%	3	10,0%	
113	52	A	15	2	13,3%	8	53,3%	3	20,0%	2	13,3%	0,96
		B	33	13	39,4%	14	42,4%	6	18,2%	0	0,0%	
		gesamt	48	15	31,3%	22	45,8%	9	18,8%	2	4,2%	
114	54	A	12	1	8,3%	2	16,7%	6	50,0%	3	25,0%	1,06
		B	19	12	63,2%	4	21,1%	3	15,8%	0	0,0%	
		gesamt	31	13	41,9%	6	19,4%	9	29,0%	3	9,7%	
115	62	A	38	19	50,0%	17	44,7%	2	5,3%	0	0,0%	0,77
		B	26	11	42,3%	6	23,1%	5	19,2%	4	15,4%	
		gesamt	64	30	46,9%	23	35,9%	7	10,9%	4	6,3%	
119	55	A	21	1	4,8%	19	90,5%	1	4,8%	0	0,0%	1,23
		B	10	0	0,0%	5	50,0%	3	30,0%	2	20,0%	
		gesamt	31	1	3,2%	24	77,4%	4	12,9%	2	6,5%	

### Auswertung der FLIP<sub>s</sub>-Färbungen

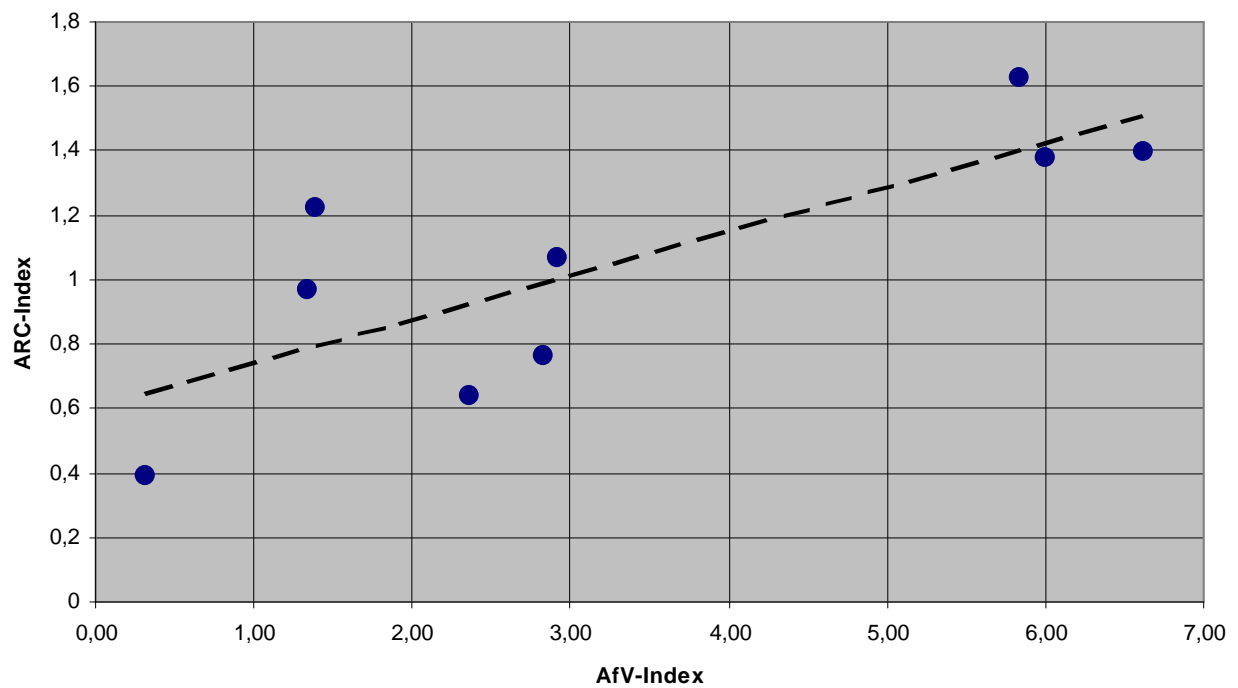
Biopsie	Alter	Abschnitt	Angeschnittene Zellen	FLIP <sub>s</sub> -freie Zellen	rel. Anteil	m. leichtem FLIP <sub>s</sub>	rel. Anteil	mäßigem FLIP <sub>s</sub>	rel. Anteil	starkem FLIP <sub>s</sub>	rel. Anteil	FLIP <sub>s</sub> -Index
<b>99</b>	42	A	34	10	29,4%	17	50,0%	5	14,7%	2	5,9%	1,76
		B	25	8	32,0%	10	40,0%	4	16,0%	3	12,0%	
		Gesamt	59	18	30,5%	27	45,8%	9	15,3%	5	8,5%	
<b>100</b>	62	A	23	5	21,7%	12	52,2%	4	17,4%	2	8,7%	1,74
		B	24	15	62,5%	5	20,8%	3	12,5%	1	4,2%	
		Gesamt	47	20	42,6%	17	36,2%	7	14,9%	3	6,4%	
<b>102</b>	52	A	15	2	13,3%	7	46,7%	4	17,4%	2	13,3%	3,20
		B	18	0	0,0%	10	55,6%	7	29,2%	1	5,6%	
		Gesamt	33	2	6,1%	17	51,5%	11	23,4%	3	9,1%	
<b>103</b>	48	A	18	2	11,1%	10	55,6%	4	22,2%	2	11,1%	2,33
		B	11	1	9,1%	3	27,3%	6	54,5%	1	9,1%	
		Gesamt	29	3	10,3%	13	44,8%	10	34,5%	3	10,3%	
<b>105</b>	42	A	16	5	31,3%	4	25,0%	5	31,3%	2	12,5%	2,25
		B	14	5	35,7%	4	28,6%	3	21,4%	2	14,3%	
		Gesamt	30	10	33,3%	8	26,7%	8	26,7%	4	13,3%	
<b>113</b>	52	A	15	1	6,7%	8	53,3%	5	33,3%	1	6,7%	3,33
		B	33	10	30,3%	18	54,5%	4	12,1%	1	3,0%	
		Gesamt	48	11	22,9%	26	54,2%	9	18,8%	2	4,2%	
<b>114</b>	54	A	12	0	0,0%	2	16,7%	4	33,3%	6	50,0%	3,08
		B	19	12	63,2%	5	26,3%	2	10,5%	0	0,0%	
		Gesamt	31	12	38,7%	7	22,6%	6	19,4%	6	19,4%	
<b>115</b>	62	A	38	15	39,5%	18	47,4%	5	13,2%	0	0,0%	1,45
		B	26	9	34,6%	9	34,6%	6	23,1%	2	7,7%	
		Gesamt	64	24	37,5%	27	42,2%	11	17,2%	2	3,1%	
<b>119</b>	55	A	21	14	66,7%	4	19,0%	3	14,3%	0	0,0%	1,33
		B	10	0	0,0%	5	50,0%	2	20,0%	3	30,0%	
		Gesamt	31	14	45,2%	9	29,0%	5	16,1%	3	9,7%	

Korreliert man nun die gewonnenen Indizes miteinander, so gewinnt man folgende drei Diagramme:

b) Verhältnis der Indices von AfV und FLIP<sub>s</sub> zueinander

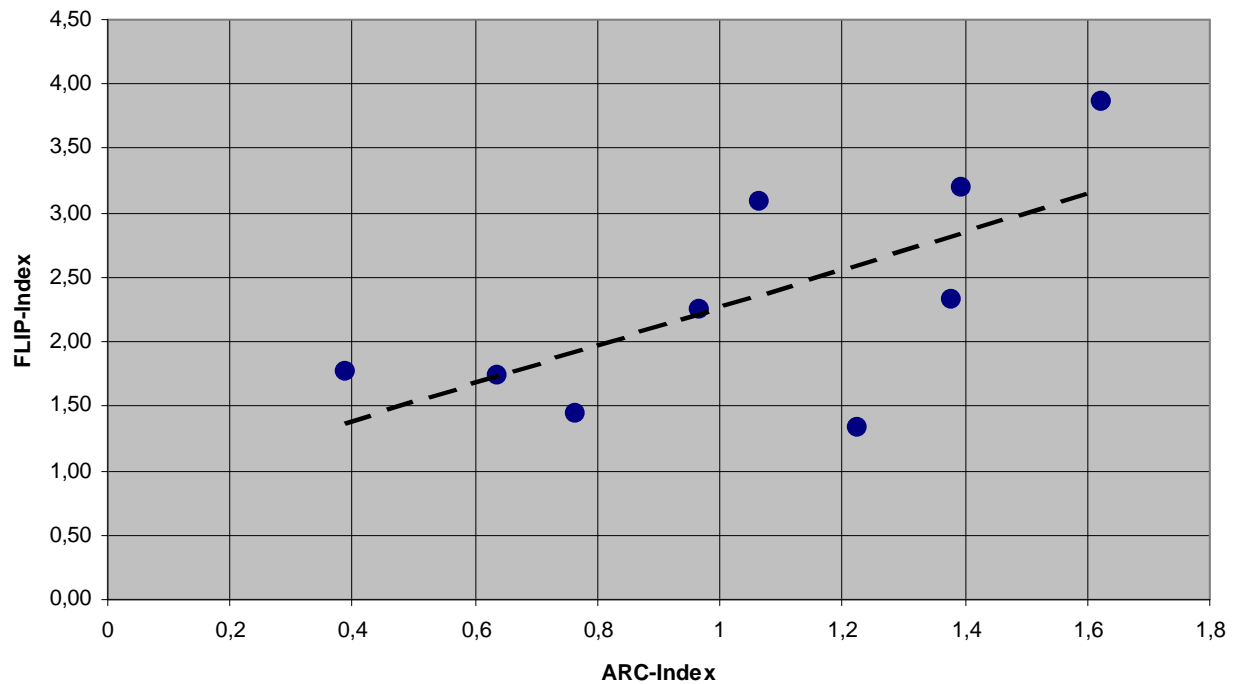


Verhältnis der Indices von Autofluoreszenzverlust und ARC zueinander





c) Verhältnis der Indizes von ARC und FLIP zueinander



Des weiteren wurden die Anzahl der Zellkerne ausgezählt, die DNA-Fragmentierung aufwiesen und zur Gesamtzahl der angeschnittenen Zellkerne gesetzt; das Ergebnis kann man nebenstehender Tabelle entnehmen. Zusammenfassend konnte statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der TUNEL-positiven Zellkerne und der Anfärbbarkeit für ARC oder FLIP<sub>S</sub> hergestellt werden. Insgesamt zeigen etwa die Hälfte aller Zellkerne (50,5%) DNA-Fragmentierung.

Biopsie	Alter	Angeschnittene Kerne	Kerne mit DNA-Frag	Anteil
99	42	2	0	0,0%
		2	1	50,0%
		4	1	25,0%
100	62	7	4	57,1%
		2	1	50,0%
		9	5	55,6%
102	52	3	2	66,7%
		6	2	33,3%
		9	4	44,4%
103	48	2	0	0,0%
		6	3	50,0%
		8	3	37,5%
105	42	6	4	66,7%
		3	0	0,0%
		9	4	44,4%
113	52	8	8	100,0%
		21	19	90,5%
		29	27	93,1%
114	54	10	9	90,0%
		1	0	0,0%
		11	9	81,8%
115	62	4	1	25,0%
		5	1	20,0%
		9	2	22,2%
119	55	1	0	0,0%
		5	3	60,0%
		6	3	50,0%
Durchschnitt:				50,5%

## **4. Diskussion**

### **4.1. Hochauflösende Immunhistochemie von Semidünnschnitten**

Technische Voraussetzung der vorliegenden Arbeit ist das Semidünnschnittverfahrens, da es einen hohen Anspruch an die Schneidetechnik mit sich bringt, wenn man von einer einzelnen Zelle möglichst viele Ebenen erstellen, danach bearbeiten und betrachten möchte. Das Verfahren wurde ursprünglich für die Elektronenmikroskopie entwickelt, deren Anforderungen an eine ultradünne Schnittführung diejenigen der Lichtmikroskopie übersteigt. Mit der Technik konnten ca. 10 Längsschnitte durch einen einzelnen Kardiomyozyten gelegt werden. Dies erlaubt eine effiziente Auswertung der naturgemäß sehr kleinen Herzmuskelbiopsien.

Dadurch konnten die immunhistologischen Versuche durchgeführt werden, im Rahmen derer in diesem Falle die Koexistenz möglicher apoptotischer Marker lichtoptisch zur Darstellung kamen. Außerdem erlaubte die Einbettung in Epon-Harz sensitivere Färbungen als in vorangegangenen Studien, auf die zum Teil auch Bezug genommen wird. Die üblichere Einbettung in Paraffin verlangt eine dickere Schnittführung im Bereich von 10 µm, womit die einzelnen subzellulären Strukturen für Antikörper nicht in der gleicher Weise zugänglich sind, wie in dem hier angewandten Verfahren [Aschoff et al. 1996]. Von welcher Relevanz dies ist, wird weiter unten noch ausführlicher erklärt.

### **4.2. Morphologische Betrachtungen**

#### **4.2.1. ARC, FLIP und der Autofluoreszenzverlust**

Die hervorstechendste Beobachtung dieser Studie ist die Koloalisation von ARC und FLIP<sub>S</sub> in geschädigten Zellen des Herzwebes. Bei genauer Betrachtung sieht man jedoch, daß die beiden Proteine zwar in der überwiegenden Zahl der Fälle gemeinsam vorkommen, allerdings nicht in jedem.

Zudem besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Verlust der zellulären Autofluoreszenz und der Anfärbbarkeit für die untersuchten Proteine. Die Autofluoreszenz ist eine wertvolle Methode zum Nachweis von intakten Zellen – viele große Proteine (unter anderem die Fibrillen) werden unter UV-Licht angeregt und bilden Fluophore, welche weißlich leuchten. Proteine, die z.B. durch endogene Enzyme zersetzt worden waren,

verlieren ihre Leuchtkraft. Daher kann unter der Autofluoreszenzlampe die myofibrilläre Degeneration beurteilen [Busch et al. 2001]. Dies gilt allerdings nicht für Arbeiten, die zum Beispiel auf in Paraffin eingebetteten Biopsien aufbauen, da dort die einzelnen Schnitte so dick geführt werden müssen, daß es unter Autofluoreszenz zur Überlagerung zu vieler Proteine kommt.

ARC und FLIP<sub>S</sub> haben im Experiment eine die Funktion der Caspasen inhibierende Wirkung, allerdings ist es noch nicht völlig unbestritten, ob man sie damit in vivo auch tatsächlich ohne Einschränkungen als „Apoptoseinhibitoren“ bezeichnen darf [Ashkenazi et al. 1998, Dowds et al. 2001]

Es finden sich aber mehr Anhaltspunkte dafür, daß es sich bei FLIP<sub>S</sub> auch unter den Bedingungen im Lebenden um ein antiapoptotisches Protein handelt. Das Enzym ist wohl integraler Bestandteil des zellulären Apparates und zumindest seine mRNA wird, laut Literatur, auch in gesunden Zellen exprimiert [Rudel et al. 1999]

In unseren Untersuchungen fanden sich allerdings die stärksten Akkumulationen genau dort, wo deutlicher Myofibrillenverlust beobachtbar war, im perinukleären Zytoplasma von Herzmuskelzellen mit DNA-Fragmentierung und auch peripher gelegener Autofluoreszenzminderung. In intakten Myozyten ließ sich praktisch nie FLIP<sub>S</sub> nachweisen. Dies mag seinen Grund auch darin haben, daß die ansonsten konstitutionell vorkommenden Mengen an FLIP<sub>S</sub> gerade durch das intakte Myofibrillennetz verdeckt werden. Das gesunde Zellskelett besteht aus vielen dichtgelagerten Proteinen, und ein Abbau der Fibrillenstruktur kann eine Demaskierung der Antigene für Antikörper wie Anti-ARC und Anti-FLIP<sub>S</sub> zur Folge haben. Insofern findet sich wiederum, selbst wenn man einen gleichbleibenden Spiegel von FLIP<sub>S</sub> in gesunden und kranken Herzzellen annähme, eine höhere Anfärbbarkeit für die Proteine dort, wo die Fibrillenstruktur deutlich geschädigt ist.

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um einen histochemischen Nachweis der fraglichen Proteine, die in der Literatur zitierten Untersuchungen basierten auf biochemischen Methoden, die letztendlich nur die entsprechende mRNA (Northern Blot [z.B. Goltsev et al. 1997]) nachgewiesen haben oder, beim direkten Nachweis des Proteins (Western Blot [z.B. Algeciras-Schimmich et al. 1999]), keine Aussage darüber zulassen, wo genau das Protein herkommt. Die Kolokalisation von FLIP<sub>S</sub> und ARC in menschlichen Kardiomyozyten wurde vor kurzem immunhistochemisch dargestellt [Ott et al. 2002].

Aufgrund dessen kann man in unseren Experimenten FLIP<sub>S</sub> als einen Apoptosemarker betrachten, da praktisch nur in geschädigten Zellen, die bereits apoptotische Prozesse wie

Myofibrillenverlust oder DNA-Fragmentierung zeigten, auch FLIP<sub>S</sub> in signifikanter Weise exprimiert bzw. sichtbar wurde.

Bei detaillierter Betrachtung der einzelnen Zellen und im Vergleich mit den Folgeschnitten zeigt sich, daß die Fläche des Bereichs starker FLIP<sub>S</sub>-Anreicherungen in auffälliger Weise dem Bereich des Myofibrillenverlustes übereinstimmt. Auch die Größe des FLIP<sub>S</sub>-Musters korreliert mit dem, das durch den Verlust an Autofluoreszenz verursacht wird.

Eine komplexere Morphometrie ist aufgrund der fehlenden Software allerdings nicht möglich gewesen und würde obendrein den Umfang einer beschreibenden Arbeit wie der vorliegenden sprengen. Allerdings konnte eine semiquantitative Auswertung angefertigt werden, wie bereits dargestellt wurde.

Bei dem Protein ARC handelt es sich ebenfalls um einen Apoptosehemmer [Koseki et al. 1998], der über mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen in die Signalkette eingreift: zum einen hemmt es, genauso wie die verschiedenen Varianten des FLIP-Proteins, kompetitiv die Caspase-8, indem es mit seiner CARD-Region die DED der Caspase blockiert [Haunstetter and Izumo 1998]. Darüber hinaus vermag es den über die Mitochondrien vermittelten und meist durch chemische oder physikalische Noxen eingeleiteten Apoptosemechanismus zu hemmen, indem es die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol unterbindet [Ekhterae et al. 1999]. Cytochrom c aktiviert im Zelleib im Zusammenspiel mit Apaf-1 Caspase-9, welche dann über eine noch nicht genau bekannter Zwischenschritte zur Aktivierung der distalen (oder Effektor-)Caspasen führt, die letztendlich den Abbau der Zelle initiieren [Inohara 1999].

Interaktionen von ARC oder FLIP<sub>S</sub> wurden bisher nicht beschrieben, sind aber wegen der strukturellen Gemeinsamkeiten denkbar. Darüberhinaus ist die bei den Caspasen und bei FLIP<sub>S</sub> vorkommende DED das Substrat der CARD von ARC [Koseki et al. 1998]. Über die praktische Bedeutung, wie z.B. eine gegenseitige Aktivierung oder auch Blockierung, kann aber nur spekuliert werden, ohne daß sich in der Literatur eine brauchbare Referenz findet. Deswegen gehe ich darauf nicht weiter ein.

In den für diese Arbeit angefertigten immunhistochemischen Färbungen zeigten die Zellen dann signifikante Anreicherungen von ARC, wenn sie auch einen deutlichen Verlust der Myofibrillenstruktur erkennen ließen. Mehr noch, der morphologische Vergleich der verschiedenen Färbungen ergibt, daß sich ARC genau in den Zellabschnitten ansammelt, in denen die Autofluoreszenz deutlich gemindert ist – wie soeben schon für FLIP<sub>S</sub> beschrieben. Folgerichtigerweise decken sich die Bereiche, in denen ARC und FLIP<sub>S</sub> vorkommen

weitgehend, sowohl auf histologischer als auch auf zellulärer Ebene, ohne sich jedoch vollends zu decken. In der Regel sind die Anfärbungen für FLIP<sub>S</sub> geringfügig stärker und typischerweise findet sich auch eine starke Zeichnung des Zellrandes, den man in gleicher Weise nicht in den ARC-Färbungen sehen kann.

ARC kommt in Zellen, die keine typischen Verformungen i.S. einer dilatativen Kardiomyopathie, ausgeprägten Myofibrillenabbau oder DNA-Fragmentierung aufweisen, kurzum: in morphologisch gesunden Zellen, in keiner lichtmikroskopisch erfaßbaren Menge vor. Im Northern Blot [Koseki et al. 1998] fand sich das für das Protein kodierende Transkript jedoch konstitutionell in Herz- und Skelettmuskulatur. Die naheliegendste Erklärung ist, daß ARC normalerweise in immunhistochemisch nicht darstellbaren Mengen exprimiert und erst unter schädigenden Einflüssen vermehrt synthetisiert wird, während die mRNA immer vorliegt. Gegen eine bloße Demaskierung der Antigene für Anti-ARC durch den Abbau des  $\alpha$ -Actin spricht, daß in morphologisch gesunden Zellen ARC nicht im perinukleären Zytoplasma nachweisbar ist, welches ja prinzipiell fibrillenfrei ist.

Die zytologischen Muster von ARC überlagerten sich immer mit denen von FLIP<sub>S</sub>, wie an den konsekutiven Semidünnschnitten sehr gut gezeigt werden konnte. Allerdings waren die tatsächlichen Muster von FLIP<sub>S</sub> und ARC keineswegs identisch, eine Kreuzreaktion der primären Antikörper gegen ARC und FLIP<sub>S</sub> kann also mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Diese wäre alleine schon wegen der unterschiedlichen Strukturen der Proteine theoretisch unwahrscheinlich und die Spezifität der Antikörper wird vom Hersteller Santa Cruz, Inc., garantiert.

Die immunzytologischen Kontrollen, denen im ersten Schritt des Protokolls kein primärer Antikörper zugesetzt wurde, die aber ansonsten nach dem gleichen Verfahren behandelt wurden, verliefen in allen Fällen negativ. Allerdings konnten keine Präabsorption unserer primären Antiseren mit FLIP<sub>S</sub> oder ARC gemacht werden, da die entsprechenden Antigene nicht verfügbar waren.

Sowohl bei den Patienten mit DCM als auch bei den als Kontrollgewebe verwendeten Biopsien fand sich ganz eindeutig eine Kolo-kalisation von ARC und FLIP<sub>S</sub> mit dem Grad der Apoptose, zu deren Beurteilung in der vorliegenden Arbeit der Grad des Myofibrillenabbaus und die DNA-Fragmentierung als Kriterien herangezogen wurden.

Allerdings muß einschränkend dazugesagt werden, daß es schlechterdings unmöglich ist, den Versuchsreihen, die an den Biopsien von herzkranken Patienten durchgeführt wurden, absolut gesundes Gewebe als Kontrolle gegenüberzustellen. Die fehlende medizinische Indikation

verbietet es, die mit nicht zu unterschätzenden Risiken und Unannehmlichkeiten verbundene Stanzbiopsie am Herzgesunden durchzuführen, womit kein entsprechendes Material zur Verfügung steht. Die in Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kontrollgewebe stellen meines Erachtens den bestmöglichen Ersatz da, es handelt sich um das Herz eines Unfallopfers, bei dem keine kardialen Vorerkrankungen bekannt waren. Allerdings ist auch hier mit zwar kurzen, aber nicht vernachlässigbaren post-mortem-Zeiten zu rechnen, bevor das Organ konserviert wurde (hierüber bestehen keine Aufzeichnungen). Das bedeutet, daß auch in diesen Zellen bereits mit Apoptose- bzw. Nekroseprozessen zu rechnen ist. Entsprechend konnten Anzeichen von Apoptose (v.a. Myofibrillenverlust) sowie Akkumulationen von ARC und FLIP<sub>S</sub> in den an und für sich als gesund geltenden Biopsien gefunden werden.

Trotzdem stellt der Nachweis von ARC und FLIP<sub>S</sub> bzw. ihre Kolokalisation mit Vorgängen i.S. des programmierten Zelltodes einen Indikator für Apoptose dar, zusätzlich zu den bisher schon gebräuchlichen TUNEL- [Aschoff et al. 1999], tTG- [Lotze et al. 2001], Aktin- [Busch et al. 2001] oder Bax/Bcl-2-Färbungen [Olivetti et al. 1997] dar.

Die Koexistenz der verschiedenen Marker stellt gegebenenfalls den Ausgangspunkt für weitere, noch ausstehende Studien zum zeitlichen Ablauf des programmierten Zelltodes dar, mit denen klinisch wirklich relevante Aussagen zur Prognose getroffen werden könnten. Besonderes Gewicht sollte man hierbei auf die Untersuchungen der verschiedenen Formen der dilatativen Kardiomyopathien legen.

#### **4.2.2 DNA-Fragmentierung und TUNEL-Färbung**

Die Zellen mit einer mehr oder minder starken Anfärbbarkeit mit ARC bzw. FLIP<sub>S</sub> zeigten zum überwiegenden Teil gleichzeitig TUNEL-positive Zellkerne, aber nicht immer.

Der prozentuale Anteil an Zellkernen, die im Rahmen dieser Arbeit mit der TUNEL-Methode positiv auf DNA-Fragmentierung markiert wurden, liegt in Abhängigkeit von Biopsie und Anschnitt zwischen 0% und 100%, der Median der Einzelergebnisse liegt bei 44,4% .

Eine solch hohe Zahl läßt sich mit der gängigen Vorstellung des programmierten Zelltodes (bei der DNA-Fragmentierung bereits ein terminales Ereignis ist) nicht in Einklang bringen, da der untersuchende Kardiologe, wenn man eine Apoptoeserate von 45% und einen längeren Krankheitsverlauf annähme, wohl kaum mehr ein Herz angetroffen hätte, um ihm eine Biopsie zu entnehmen.

Dieses Ergebnis läßt sich jedoch verschiedenartig erklären:

- 1) Die TUNEL-Methode ist zu unspezifisch. Der Nachweis der DNA-Fragmentierung mittels des TUNEL-Verfahrens ist schon seit längerem in der Kritik, viele Veröffentlichungen legen nahe, daß damit nicht nur apoptotische, sondern auch nekrotische Zellen markiert werden [Frankfurt 1998]. Eine neuere Theorie postuliert, daß nicht nur Doppelstrangbrüche mit freiem 3'-OH-Ende, wie sie die DNase I hervorbringt und welche absolut apoptosetypisch sind [Guerra et al. 1999], sondern auch Einzelstrangbrüche mit freiem 3'-OH-Ende markiert werden, wie sie z.B. auch vorübergehend im Rahmen von Reperaturprozessen vorkommen [Kanoh et al. 1999]. Dies würde die Hypothese einer kardialen Regenerationsfähigkeit nähren, auf die weiter unten noch eingegangen wird. Das Vorkommen von ARC und FLIP<sub>S</sub> in Herzzellen mit DNA-Fragmentierung ließe sich somit als gemeinsame Anstrengung deuten, um die angeschlagene Zelle zu stabilisieren. Allerdings muß dazu gesagt werden, daß die Angaben über die Verlässlichkeit der TUNEL-Färbung unterschiedlich sind und sie noch immer der gebräuchlichste Apoptosenachweis ist [Dispersyn et al. 2001].
- 2) Hinzukommend kann man noch annehmen, daß das hier verwendete Protokoll der TUNEL-Färbung viel sensitiver ist, als in vorangegangenen Studien. Die meisten Versuche in anderen Laboratorien wurden an paraffineingebetteten Gewebeproben durchgeführt, die eine viel dickere Schnittführung erfordern als die hier angewandte Einbettung in Epon-Harz. Damit ist unser Verfahren bis zu 100mal sensitiver als das von ähnlichen Studien, weshalb auch DNA-Fragmentierung, z.B. im Sinne der genannten Reperaturprozesse, zur Darstellung kommt, im Gegensatz zu Arbeiten an Paraffinschnitten [Aschoff et al. 1996]
- 3) Die bisher geltende Vorstellung der Apoptose als ein Vorgang, der sich innerhalb weniger Stunden vollzieht, kann so nicht stimmen. Wie weiter oben bereits erwähnt, ist es eher unwahrscheinlich, daß ein Organ wie das Herz, deren Regenerationsvermögen limitiert bleibt, apoptotische Prozesse überhaupt überleben würde, wenn man sie als unumkehrbar und innerhalb eines Tages ablaufend begreift. Vielmehr ist es denkbar, daß pro- und antiapoptotische Prozesse sich über lange Zeit die Waage halten [Communal et al. 2002]. In diesem Sinne überrascht also auch nicht das Nebeneinander von Zellkernen, die DNA-Fragmentierung i.S. des programmierten Zelltodes aufweisen und antiapoptotischer Faktoren wie ARC und FLIP<sub>S</sub>. Dieser Logik entspricht es auch, daß es eben jene Zellen mit stark geschädigtem kontraktilen Apparat sind, in denen diese beiden Proteine am

deutlichsten nachzuweisen sind. Insofern könnte eine gesteigerte Synthese von ARC und FLIP<sub>S</sub> Antwort auf eine gestörte Zellintegrität sein.

Aufgrund rascher Verarbeitung der Biopsien ist eine in situ-Degeneration eher unwahrscheinlich, während dies bei den als Kontrollmaterial dienenden Proben während der post-mortem-Zeit mit Sicherheit der Fall war. Das erklärt auch, weshalb sich auch dort Anreicherungen von ARC und FLIP<sub>S</sub> i.S. eines ischämischen Apoptosegeschehens gefunden haben und dadurch die Qualität als Kontrollmaterial einschränken.

### **4.3. Funktionelle Bedeutung**

#### **4.3.1. Zur bestehenden Vorstellung über die Apoptose**

Die bisher gängige Vorstellung der Apoptose als Prozeß, der sich innerhalb weniger Stunden (zwischen 20 Minuten und 24 Stunden) vollzieht [Olivetti et al. 1997], kann so nicht stimmen, jedenfalls nicht unter der Voraussetzung, daß der programmierte Zelltod unaufhaltbar ist, sobald er erst einmal initialisiert wurde. Es handelt sich wohl um einen viel differenzierteren Ablauf, in dem z.B. auch einzelne Organellen und Strukturen apoptotisch abgebaut werden können, während die Zelle als Ganzes weiterexistiert – wenn auch funktionell stark eingeschränkt [Communal et al. 2002].

Einer der zellulären Mechanismen zur Verhinderung des vorzeitigen Untergangs bedient sich der Gewebe-Transglutaminase (tTG), eines Enzyms, das intra- und extrazelluläre Proteine vernetzt und so z.B. zur Bildung von Narbengewebe und der Stabilisierung der untergehenden Zelle beiträgt [Grabarek et al. 2002]. Das Enzym mit seinen Auswirkungen wird beim Morbus Alzheimer in beeindruckender Weise bildlich sichtbar, da die lichtmikroskopisch mühelos zu erkennenden amyloiden Plaques auch aus extrazellulärer Transglutaminase (tTG) bestehen. [Benzinger et al. 1998].

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die Immunreaktivität für tTG in Myokardbiopsien mit einer enzymatischen Auflösung von Aktin, d.h. einem Verlust von Myofibrillen, korreliert [Busch et al. 2001]. Offenbar bietet der geschädigte Kardiomyozyt Teile des kontraktilen Apparates dem Enzym geradezu an, um dadurch die Zelle zu stabilisieren, andere Strukturen vor dem äußerst reaktiven Protein zu schützen und sich somit vor dem entgültigen Untergang zu bewahren.

Dieser Verlust an Myofibrillen entspricht den in dieser Arbeit beschriebenen Helligkeitsminderungen bestimmter Areale unter der Autofluoreszenzlampe. Ausgehend vom



perinukleären Zytoplasma beobachteten wir in jenen Kardiomyozyten, deren Zellkern DNA-Fragmentierung (TUNEL-positiv) zeigte, verstärkten Verlust an Eigenleuchtkraft. Daraus läßt sich schließen, daß offenbar eine signifikante Korrelation zwischen DNA-Fragmentierung und Abbauprozessen des kontraktiven Systems existiert, sei es nun, daß sie sich in irgendeiner Weise direkt gegenseitig bedingen oder jeder Prozeß für sich zeitgleich durch dritte Einflußfaktoren getriggert wird. Konsequenz wäre, so oder so, eine Einschränkung der kardialen Pumpleistung durch den kumulierenden Verlust der einzelnen zellulären Kontraktionsfähigkeit bei Patienten mit DCM [Communal et al. 2002].

#### **4.3.2. Zur Vorstellung über den statischen Kardiomyozyten**

Es gilt fast überall noch als unangefochten, daß im Herzen praktisch keine regenerative Zellteilung stattfindet. Seit einigen Jahren mehren sich die Beobachtungen, daß sich Herzmuskelzellen, v.a. unter krankhaften Bedingungen, sehr wohl vermehren können – zu allgemeiner Anerkennung hat es diese Annahme allerdings noch nicht gebracht. Die Vorstellung der Teilungsunfähigkeit der Kardiomyozyten stammt aus den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts, nachdem keine nennenswerte Zahl an Mitosefiguren im Herzgewebe gefunden werden konnte [Kajstura 1998]. Doch die Vorstellung, daß diese Zellen, so sie kurz nach der Geburt ihre endgültige Anzahl erreicht hätten und lediglich weiter an Masse zunähmen, in einigen Fällen 100 Jahre lang 70 Kontraktionen pro Minute bewältigen würde implizieren, daß diese Zellen unter Idealbedingungen de facto unsterblich sind, sowohl strukturell als auch funktionell. Solch eine Annahme widerspricht allerdings dem Konzept zellulärer Alterung und programmierten Zelltodes und der Logik eines langsamen und steten Austauschs der Zellen in den Organen im Laufe des Lebens [Kajstura 1998]. Demgegenüber steht, daß das gesunde männliche Herz im Laufe des Erwachsenenlebens  $64 \times 10^6$  Herzzellen pro Jahr durch Apoptose verliert [Olivetti et al. 1995], das entspräche bei angenommenen  $6 \times 10^9$  Kardiomyozyten einem jährlichen Verlust von einem Prozent an kontraktile Masse. Am weiblichen Herzen im übrigen nicht [Guerra et al. 1999], womit mit den Hormonen ein weiterer Einflußfaktor auf den Lebenszyklus eines Kardiomyozyten ins Spiel käme, was diese Arbeit aber bei weitem sprengen würde; es soll nur darauf hingewiesen werden, daß vorwiegend Männer von kardialen Erkrankungen betroffen sind. Darüber hinaus nehmen programmierter und akzidentieller Zelltod im versagenden Herzen um bis zu Faktor 85 zu [Guerra et al. 1999]. Vor noch nicht allzu langem nahm man übrigens an, daß im Herzen

überhaupt keine Apoptose stattfinden dürfte [Narula et al. 1998], wegen der vermeintlichen fehlenden Teilungsfähigkeit der Kardiomyozyten.

Neuere Untersuchungstechniken, die der der 20er Jahre überlegen sind und diverse immunhistochemischen Verfahren haben entsprechend untrügliche Hinweise darauf erbracht, daß in Herzmuskeln auch entsprechende regenerative Zellteilung stattfindet. Vor allem das Labor von Anversa hat in einer Reihe von Publikationen veröffentlicht, daß die Anzahl von gesunden Herzzellen mit Mitosekörperchen bei ca.  $14 \times 10^6$  liegt, was sich im Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie auf über 130 fast verzehnfachen kann [Kajstura et al. 1998]. Außerdem kann auch im gesunden Organ eine gewisse Fraktion an Zellen nachgewiesen werden, die die zellteilungsspezifischen Proteine Ki67 und Telomerase exprimieren, deren Anteil unter den Bedingungen des versagenden Herzens um bis zu Faktor 17 zunimmt [Kajstura et al. 1998; Beltrami et al. 2001; Leri et al. 2001]. All diese Zahlen in eine vernünftiges vergleichendes Verhältnis zueinander zu setzen ist derzeit nicht wirklich möglich, da der Zeitverläufe der einzelnen Prozesse wie Zellteilung, Apoptose und Nekrose im Herzen nicht genau bekannt sind. Darüber hinaus ist es schwierig, z.B. Prophasekerne sicher zu diagnostizieren, was die Präzision der Aussage weiter einschränkt [Leri et al. 2001]. Trotz aller Einschränkungen läßt sich aus diesen Beobachtungen aber der Schluß ziehen, daß die Möglichkeiten des Herzens, sich verschiedenen Situationen und Belastungen anzupassen, bei weitem nicht so limitiert sind, wie lange Zeit angenommen. In der Folge führen ein günstiges Verhältnis zwischen sich teilenden und der Apoptose anheimfallenden Herzmuskelzellen in der dilatativen Kardiomyopathie zu einer besseren Überlebensrate [Metzger et al. 2002].

In diesem Falle wäre es von großem Interesse, in weitergehenden Studien Zusammenhänge zwischen der Konzentration von ARC bzw. FLIP<sub>s</sub> in den Kardiomyozyten und der Langzeitentwicklung der DCM-Patienten zu ergründen.

#### **4.3.3. Zur Relevanz der Apoptose im kranken Herzen**

Einige Autoren haben in ihren Publikationen die Relevanz der Apoptose im Krankheitsverlauf bei kardialen Leiden näher beleuchtet. Wie eingehend schon erwähnt wurde, schwanken die Angaben über die absolute Zahl apoptotischer Zellen stark, die Problematik liegt wegen des Mangels eines unumstritten eindeutigen Nachweises bereits im Kern der Sache.

Allgemein geht man jedoch in der DCM von einer Apoptoserate aus, die im der Größenordnung von 1:10.000 Zellen liegt. Auch wenn das auf den ersten Blick eher gering erscheinen mag, muß man aber berücksichtigen, daß wenn 1) der menschliche linke Ventrikel

ca.  $6 \times 10^9$  Kardiomyozyten enthält, 2) die kardiomyozytäre Apoptoserate bei 1:10,000 liegt, 3) eine Herzmuskelzelle für jeden positiv gelabelten Kern mit DNA-Fragmentierung angenommen wird, sowie 4) einer Dauer von 24h für den Apoptoseverlauf und 5) keine Zellteilung, so kann man einen Verlust an kontraktile Masse von nahezu 4% pro Jahr annehmen [Sabbah 2001]. Aufgrund der Vielzahl der Annahmen, die Sabbah hier voraussetzt, unterliegt das Ergebnis einer gewissen Unschärfe. Dennoch ist der jährliche Verlust von Muskelmasse, der im Prozentbereich liegt, nicht zu vernachlässigen. Andererseits findet offenbar doch eine, wenn auch eingeschränkte, zelluläre Regeneration statt. Dies muß jedoch nicht unbedingt zu einem Dickenwachstum der Ventrikelwände und damit zu einer Kompensation des Kraftverlustes im Herzen führen, sondern könnte genauso gut in einem Längenwachstum der Muskelfasern enden, was dann wiederum eine Verschlechterung der Situation mit sich brächte [Kajstura et al. 1998].

In klinischen Studien hat bereits entsprechend gezeigt, daß ein günstiges Verhältnis von möglichst vielen sich replizierenden Kardiomyozyten zu möglichst wenigen apoptotischen Herzmuskelzellen mit einem besseren Outcome in der dilatativen Kardiomyopathie korreliert [Metzger et al. 2002]

## **5.   Schlußfolgerung**

### **5.1.   Anwendbarkeit der ARC- und FLIP<sub>S</sub>-Färbung**

Mit dem immunhistochemischen Simultannachweis von FLIP<sub>S</sub> und ARC ist ein weiteres Werkzeug für die hochauflösende Untersuchung myokardialer Biopsien geschaffen worden.

Wichtig dabei ist, daß es sich bei den mit anti-ARC oder anti-FLIP<sub>S</sub> markierten Zellen in einem kritischen Zustand handelt, die aber hinsichtlich des Zelltodes noch vor dem point-of-no-return stehen. Ein hoher Anteil der Proteine zeigt eher gewisse Zelluntergangstendenzen, als fortgeschrittene Stadien der Apoptose. Der relative Anteil dieser Zellen kann ein evtl. wichtiges Indiz zur Einschätzung der Prognose sein. Dazu wären aber Langzeitstudien nötig, die man den sich ändernden Anteil an ARC- und FLIP<sub>S</sub>-positiven Zellen mit dem Krankheitsverlauf korrelieren müßte.

Eine zumindest semiquantitative Korrelation zwischen den immunreaktiven Flächen der ARC- bzw. FLIP<sub>S</sub>-positiv-gefärbten Bereiche und des Myofibrillenverlustes ist herstellbar. Vor allem dadurch, daß hierbei der kontraktile Apparat in seinen Ab- und Umbauprozessen indirekt zur Darstellung kommt, hängen die mit dieser Methode gezeigte Expression von ARC und FLIP<sub>S</sub> wohl unmittelbarer mit einer eingeschränkten kardialen Pumpleistung zusammen als z.B. der einfache Nachweis von Zellkernen mit DNA-Fragmentierung.

### **5.2.   Klinischer Ausblick**

Die routinemäßige Bestimmung des myokardialen Gehaltes an ARC und FLIP<sub>S</sub> könnte unter Umständen eine Hilfe bei Diagnose der Schwere bzw. des Stadiums der dilatativen Kardiomyopathie und, darauf fußend, der Prognose der Erkrankung darstellen. Der histologische Nachweis ist denkbar einfach und von verhältnismäßig geringem Zeitaufwand.

Darüber hinaus wäre es von großer praktischer Bedeutung zu wissen, inwieweit Faktoren wie ARC und FLIP<sub>S</sub> ins Serum freigesetzt werden und folglich im Blut nachweisbar wären. Sollte sich eine signifikante Korrelation der Schwere der DCM (oder auch anderer Herzerkrankungen) mit einem Anstieg gewisser Parameter im Serum finden, könnte den Kliniken evtl. ein weiteres diagnostisches Werkzeug an die Hand gegeben werden.

Nicht zuletzt sollte natürlich auch darüber nachgedacht werden, ob die antiapoptotische Wirkung der hier behandelten Proteine sich nicht irgendwie zur Bekämpfung der

Zelldeformationen und der damit einhergehenden Funktionsstörungen, die letztlich zur terminalen Herzinsuffizienz führen, verwenden ließen. Damit allerdings konfrontiert man sich automatisch mit einer ganzen Reihe von Schwierigkeiten, angefangen damit, wie man einen auf Caspasehemmern aufbauenden Wirkstoff (spezifisch) an seinen Bestimmungsort bringen kann, bis dahin, welche Nebenwirkungen ein Eingriff in den natürlichen Lebenszyklus einer Zelle mit dem für sie vorgesehenen Ende mit sich bringen würde. Erste Experimente, bei denen an Hasen die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch den adenoviral vermittelte Einbau des Gens für p35 und die daraus folgende gesteigerte Expression dieses Caspase-3-Hemmers verzögert werden konnte [Schömig et al. 2001], geben auch für den Therapie am Menschen Anlaß zu großen Erwartungen.

Andere Einsatzmöglichkeiten finden sich evtl. auch in anderen Organsystemen, z.B. im Gehirn oder Immunsystem, wo Apoptose ähnlich fatale Folgen haben kann.

Allerdings sollte man noch folgendes dabei bedenken: Die Apoptose ist letztlich ein Schutzmechanismus, mit dem der Körper die Integrität eines Organs oder des gesamten Organismus' dadurch beschützen möchte, indem er Zellen aussondert, in unter den gegebenen Bedingungen auch eine Gefahr darstellen können. Sollte man die Zelle davon abhalten, den Weg der Autoelimination zu beschreiten, könnte es ja auch passieren, daß eine solche Zelle bei fortdauernder Überbelastung am Ende nekrotisch wird oder aber dedifferenziert [Dispersyn et al. 2001].

## 6. Zusammenfassung

Myokardbiopsien von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) lassen sich nach Einbettung in Kunstharz effizient histochemisch untersuchen. Die Sensitivität verschiedener Verfahren läßt sich hierbei durch die Möglichkeit einer sehr dünnen Schnittführung auf ein Vielfaches steigern.

Apoptose (auch „programmierter Zelltod“) zeichnet sich durch verschiedene biochemische Vorgänge aus, die Energie verbrauchen und zum Teil eine de-novo-DNA-Synthese erfordern. Viele dieser Prozesse lassen sich u.a. histochemisch nachweisen.

Caspasen sind Proteine, die in eine komplexe Signalkaskade eingebettet sind, und Anteil an der Steuerung des programmierten Zelltodes nach Stimulation durch diverse Auslöser, wie z.B. durch Rezeptoren oder mitochondrial vermittelte Apoptose, haben.

ARC inhibiert die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, einem Triggerprozeß bei der Caspasenaktivierung. ARC läßt sich im Zytoplasma von geschädigten Kardiomyozyten im Rahmen der DCM darstellen. FLIP<sub>S</sub> hemmt kompetitiv Caspase-8 und findet sich ebenfalls im Zytoplasma von geschädigten Herzmuskelzellen bei DCM.

Man kann einen Abbau des Aktin-Zytoskeletts, erkennbar an einem Autofluoreszenzverlust unter Stimulation mit 440nm(blau)-Licht, nachweisen. Die Zellabschnitte, in denen sich Anreicherungen von ARC bzw. FLIP<sub>S</sub> zeigen, decken sich weitgehend, aber nicht vollständig, miteinander und mit dem Autofluoreszenzverlust.

Ein Teil der Zellen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zeigt DNA-Fragmentierung, erkennbar an der positiven TUNEL-Färbung. Der sehr hohe Anteil von Zellen mit DNA-Fragmentierung macht es unwahrscheinlich, daß alle diese Zellen apoptotisch sind. Diese ist daher wohl nicht auf den programmierten Zelltod, sondern auf Reparatur- und Replikationsprozesse zurückzuführen. Die TUNEL-Färbung ist daher als alleiniges Verfahren zum Apoptosenachweis ungeeignet.

ARC und FLIP<sub>S</sub> lassen sich in Herzmuskelzellen nachweisen, die sich offenbar in einem kritischen Zustand im Rahmen der DCM befinden, allerdings noch nicht ein unumkehrbares Stadium der Apoptose erreicht haben. Daher könnten die Proteine in Zukunft einen wichtigen Marker zur Prognose der Erkrankung darstellen. Dazu sind allerdings noch weitere Studien nötig, die sich auf den Zusammenhang der ARC- und FLIP<sub>S</sub>-Expression mit dem klinischen Bild konzentrieren.

## Summary

Myocardial biopsies of patients with dilative cardiomyopathy (DCM) can efficiently be examined histochemically after embedding in EPON, an artificial resin. Sensitivity of various methods can hereby be improved because very thin cuts through the biopsies are made possible.

Apoptosis (also known as „programmed cell death“) is characterized by several biochemical procedures which consume energy and partly need de novo DNA-synthesis. Many of these processes can be shown histochemically.

Caspases are proteins which are part of a complex signalling chain that controls apoptosis after triggering by various factors, e.g. receptor stimulated cell death or apoptosis mediated by mitochondria.

ARC inhibits the release of mitochondrial cytochrom c into the cytoplasm, one of the main triggering processes of caspase activation. ARC can be found in cell bodies of damaged cardiomyocytes during DCM. FLIP<sub>S</sub> competitively inhibits caspase-8 and can also be detected in the cytoplasm of damaged cardiomyocytes during DCM.

Dismantling of the cytoskeletal actin structures can be shown by the loss of auto fluorescence under stimulation by 440nm (blue) light. The cellular segments in which ARC and FLIP<sub>S</sub> accumulate significantly coincide largely, but not fully, with one another and with the loss of auto fluorescence.

Some of the cardiomyocytes found in biopsies taken from DCM patients show DNA fragmentation, made visible by positive TUNEL staining. The very high fraction of cells with DNA fragmentation makes it improbable that all these cells are apoptotic. This is much more likely due to processes of repair and replication than programmed cell death. Therefore the TUNEL method alone obviously is not apt for marking apoptosis.

ARC and FLIP<sub>S</sub> can be proven in cardiomyocytes that evidentially are in a critical stage during DCM but which have not yet reached the point-of-no-return of apoptotic cell death. Therefore the proteins might become important markers as to estimating the prognosis of the disease. But until then more studies with emphasis on the relation between ARC and FLIP<sub>S</sub> with the clinical situation will be necessary.

## 7. Literaturverzeichnis

Adams JM, Cory S: The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 1998, 281:1322-6

Algeciras-Schimmich A, Griffith TS, Lynch DH, Paya CV: Cell Cycle-Dependent Regulation of FLIP Levels and Susceptibility to Fas-Mediated Apoptosis. *J Immunol.*, 1999, 162: 5205–11

Aschoff AP, Jantz M, Jirikowski GF: In-situ end labelling with bromodeoxyuridine - an advanced technique for the visualization of apoptotic cells in histological specimens. *Horm. Metab. Res.* 1996, 28:311-4

Aschoff AP, Ott U, Fünfstück R, Stein G, Jirikowski GF: Colocalization of BAX and BCL-2 in small intestine and kidney biopsies with different degrees of DNA fragmentation. *Cell Tissue Res.* 1999, 296:351-7

Ashkenazi A, Dixit VM: Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 1998, 281:1305-8

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001, 7:1750-7

Benzinger TL, Gregory DM, Burkoth TS, Miller-Auer H, Lynn DG, Botto RE, Meredith SC: Propagating structure of Alzheimer's beta-amyloid(10-35) is parallel beta-sheet with residues in exact register. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:13407-12

Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN: Myocyte Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in the Mouse Localizes to Hypoxic Regions but Occurs Independently of p53. *J. Clin. Invest.* 1997, 6:1363-72

Busch HJ, Jirikowski GF, Aschoff AP, Lotze U: Actin in semithin sections of myocardial biopsies as a tool to visualize myofibrillary degradation in humans. *Cell. Mol. Biol.* 2001, 47:89-94

Chao C, Saito S, Kang J, Anderson C, Appella E, Xu Y: p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO* 2000, 19:4967-75

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM: FADD/MORT1 Is a Common Mediator of CD95 (Fas/APO-1) and Tumor Necrosis Factor Receptor-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996 A, 271:4961-5

Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM: Molecular Ordering of the Cell Death Pathway. *J. Biol. Chem.* 1996 B, 271:4573-6

Chinnaiyan AM, Dixit VM: The cell-death machine. *Curr. Biol.* 1996, 5:555-62



- Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ: Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99:6252-6
- Condorelli G, Roncarati R, Ross J Jr, Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C, Croce CM: Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98:9977-82
- Costantini P, Bruey JM, Cstedo M, Métivier D, Loeffler M, Susin SA, Ravagnan L, Zampami N, Garrido C, Kroemer G: Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002, 9:82-8
- deBlois D, Orlov SN, Hamet P: Apoptosis in cardiovascular remodeling--effect of medication. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2001, 15:539-45
- Dispersyn GD, Borgers M: Apoptosis in the heart: about programmed cell death and survival. *News Physiol. Sci.* 2001, 16:41-7
- Dowds TA, Sabban EL: Endogenous and exogenous ARC in serum withdrawal mediated PC12 cell apoptosis: a new pro-apoptotic role for ARC. *Cell Death Differ.* 2001, 8:640-68
- Ekhterae D, Lin Z, Lundberg MS, Crow MT, Brosius FC III, Núñez G: ARC Inhibits Cytochrome c Release From Mitochondria and Protects Against Hypoxia-Induced Apoptosis in Heart-Derived H9c2 Cells. *Circ. Res.* 1999, 85:e70-7
- Figulla HR, Kellermann AB, Stille-Siegener M, Heim A, Kreuzer H: Significance of coronary angiography, left heart catheterization, and endomyocardial biopsy for the diagnosis of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1992, 124:1251-7
- Frankfurt O: Detection of Apoptotic Cells with Monoclonal Antibodies to Single-Stranded DNA. *Apoptosis Detection and Assay Method*, Hrsg. Zhu L, Chun J 1998, 47-62
- Giannitsis E, Krautzig S, Kurowski V, Renz-Polster H, Schwabe K, Stierle U: Herz. Aus: Renz-Polster H, Braun J (Hrsg.) *Basislehrbuch Innere Medizin*, 2.Auflage, Urban & Fischer-Verlag, München und Jena 2001; S. 116-21.
- Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, Wallach D: CASH, a Novel Caspase Homologue with Death Effector Domains. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:19641-4
- Grabarek J, Ardelt B, Kunicki J, Darzynkiewicz Z: Detection of in situ activation of transglutaminase during apoptosis: Correlation with the cell cycle phase by multiparameter flow and laser scanning cytometry. *Cytometry* 2002, 49:83-9
- Green DR, Reed JC: Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998, 281:1309-12
- Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P: Myocyte Death in the Failing Human Heart Is Gender Dependent. *Circ. Res.* 1999, 85:856-66
- Gurevich RM, Mustapha S, Kirshenbaum LA: Molecular Mechanisms of Apoptosis in Heart Failure. *Heart Failure Reviews* 1999, 4:157-63

- Haunstetter A, Izumo S: Apoptosis, Basic Mechanisms and Implications for Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 1998;82:1111-29
- Hennino A, Berard M, Casamayor-Pallejà, Krammer PH, Defrance T: Regulation of the Fas Death Pathway by FLICE-Inhibitory Protein in Primary Human B Cells. *J. Immun.* 2000, 165:3023-30
- Hofmann K, Bucher P, Tschopp J: The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *TIBS* 1997, 22:155-6
- Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM: I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997, 272:17255-7
- Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Núñez G: Nod1, an Apaf-1-like Activator of Caspase-9 and Nuclear Factor- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 1999, 274:14560–7
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997, 388:190-5
- Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P: Myocyte proliferation in end-stage cardiac failures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:8801-5
- Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Toshiyuki N, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H: Significance of Myocytes With Positive DNA In Situ Nick End-Labeling (TUNEL) in Hearts With Dilated Cardiomyopathy – Not Apoptosis but DNA Repair. *Circulation* 1999, 99:2757-64
- Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J: FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol.* 1998, 161:3936-42.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972, 26:239-56
- Kirchhoff S, Müller WW, Krueger A, Schmitz I, Krammer PH: TCR-Mediated Up-Regulation of c-FLIP<sub>short</sub> Correlates with Resistance Toward CD95-Mediated Apoptosis by Blocking Death-Inducing Signaling Complex Activity. *J. Immunol.*, 2000, 165: 6293-00.
- Koseki T, Inohara N, Chen S, Núñez G: ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:5156-60
- Leri A, Barlucchi L, Limana F, Deptala A, Darzynkiewicz, Hintze TH, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P: Telomerase expression and activity are coupled with myocyte proliferation and preservation of telomeric length in the failing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98:8626-31
- Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P: Stretch-mediated Release of Angiotensin II Induces Myocyte Apoptosis by Activating p53 That Enhances the Local Renin-Angiotensin System and Decreases the Bcl-2-to-Bax Protein Ratio in the Cell. *J. Clin. Invest.* 1998, 101:1326-42

Lotze U, Busch HJ, Aschoff A, Gluck B, Sigusch H, Jirikowski G, Stelzner A, Figulla HR: Damaged myocytes as detected by the colocalization of DNA fragmentation and tissue transglutaminase and their prognostic significance in enterovirus-associated dilated cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest* 2001, 31:744-55

Maisch B: Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO/ISFC Task Force – Mehr Fragen als Antworten? *Med. Klin.* 1998, 93:199-209

Matsumori A, Furukawa Y, Hasegawa K, Sato Y, Nakagawa H, Morikawa Y, Miura K, Ohno Y, Tamakoshi A, Inaba Y, Sasayama S: Epidemiologic and clinical characteristics of cardiomyopathies in Japan: results from nationwide surveys. *Circ J* 2002, 66:323-36

Maulik N, Das DK: Apoptosis, Heart Failure, Ischemic Heart Disease. *Heart Failure Reviews* 1999, 4:165-73

Metzger M, Higuchi ML, Moreira LF, Chaves MJF, Castelli JB, Silvestre JML, Bocchi E, Stolf N, Ramires JA: Relevance of apoptosis and cell proliferation for survival of patients with dilated cardiomyopathy undergoing partial left ventriculectomy. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002, 6:394-9

Milting H, Bartling B, Schumann H, El-Banayosy A, Wlost S, Rüter F, Darmer D, Holtz J, Körfer R, Zerkowski HR: Altered Levels of mRNA of Apoptosis-Mediating Genes After Mid-Term Mechanical Ventricular Support in Dilative Cardiomyopathy – First Results of the Halle Assist Induced Recovery Study (HAIR). *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1999, 47:48-50

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffiki C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM: FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death-Inducing Signaling Complex. *Cell* 1996, 85:817-27

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hojjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw DA: Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N. Engl. J. Med.* 1996, 335:1182-9

Narula J, Chandrasekhar Y, Dec GW: Apoptosis in heart failure: a tale of heightened expectations, unfulfilled promises and broken hearts... *Apoptosis* 1998, 3:309-15

Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E: In Situ Apoptotic Cell Labeling by the TUNEL Method: Improvement and Evaluation on Cell Preparations. *J. Histochem. Cytochem.* 1996, 44:959-68

Neuss M, Monticone R, Lundberg MS, Chesley AT, Fleck E, Crow MT: The Apoptotic Regulatory Protein ARC (Apoptosis Repressor with Caspase Recruitment Domain) Prevents Oxidant Stress-mediated Cell Death by Preserving Mitochondrial Function. *J. Biol. Chem.* 2001, 271:33915-22

Nicholson DW and Thornberry NA: Caspases: killer proteases. *TIBS* 1997, 22:299-306

Olbrich HG: Epidemiologie – Ätiologie der Dilatativen Kardiomyopathie. *Z. Kardiol.* 2001, 90:I/2-9

- Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P: Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995, 26:1068-79
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Loreto CD, Beltrami CA, Krajewski S, Creed JC, Anversa P: Apoptosis in the failing human heart. *N. Engl. J. Med.* 1997, 336:1131-41
- Ott DVM, Aschoff AP, Jirikowski GF, Lotze U: Localization of the apoptosis repressor ARC and anti-apoptotic factor FLIP in endomyocardial biopsies of cardiomyopathic patients. *Eur. J. Anat.* 2002, 6:661-5
- Pistritto G, Jost M, Srinivasula SM, Baffa R, Poyet JL, Kari C, Lazebnik Y, Rodeck U, Alnemri ES: Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death Differ.* 2002, 9:995-1006
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarsfas I, Martin I, Nordet P: Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996, 93:841-2
- Rudel T: Caspase Inhibitors in Prevention of Apoptosis. *Herz* 1999, 24:236-41
- Sabbah HN: Apoptosis in Heart Failure: A Real Problem? *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2001, 15:525-8
- Schannwell CM, Schoebel FC, Marx R, Plehn G, Leschke M, Strauer BE: Prognostische Relevanz linksventrikulärer diastolischer Funktionsparameter bei dilatativer Kardiomyopathie. *Z. Kardiol.* 2001, 90:269-79
- Schömig A, Laugwitz KL, Ungerer M, Moretti A, Weig HJ, Gillitzer A, Pinkernell K, Ott T, Pragst I, Städele C, Seyfarth M: Blocking Caspase-Activated Apoptosis Improves Contractility in Failing Myocardium. *Human Gene Therapy* 2001, 12:2051-63
- Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV: Casper Is a FADD- and Caspase-Related Inducer of Apoptosis. *Immunity* 1997, 6:751-63
- Sigusch H, Reinhardt D, Figulla HR: Klinisches Bild und Differentialdiagnose von Kardiomyopathie und Myokarditis. *Med. Klin.* 1998; 93: 236-9
- Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S, Wan Y, Fernandes-Alnemri T, Corce C, Litwack G, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Alnemri ES: FLAME-1, a Novel FADD-like Anti-apoptotic Molecule That Regulates Fas/TNFR1-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:18542-5
- Thomas C, Gebert G: Herz – Gefäße. Aus: Thomas C (Hrsg.): Spezielle Pathologie. Schattauer Verlag, Stuttgart und New York 1996, S. 176f.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mallmann C, Burns K, Bodmer JL, Schröter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J: Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997, 386:517-21

- Thompson CB: Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* 1995, 267:1456-62
- Tschopp J, Irmeler M, Thome M: Inhibition of Fas death signals by FLIPs. *Curr. Opin. Immun.* 1998, 10:552-8
- Vaux DL, Strasser A: The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93:2239-44
- Yoshikawa H, Nakajima Y, Tasaka K: Enhanced Expression of Fas-Associated Death Domain-Like IL-1-Converting Enzyme (FLICE)-Inhibitory Protein Induces Resistance to Fas-Mediated Apoptosis in Activated Mast Cells. *J. Immun.* 2000, 165:6262-9
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The *C. elegans* Cell Death Gene *ced-3* Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme. *Cell* 1993, 75:641-52

## **Vielen Dank:**

Besonders herzlich möchte ich meinem Doktorvater Prof. Gustav F. Jirikowski für die Möglichkeit, unter seiner Obhut diese Promotionsarbeit anzufertigen, danken. Sowohl sein fachliches Wissen, das er mir jederzeit im Gespräch bereitwillig zur Verfügung stellte als auch sein persönlicher Rat, mit dem er mir Ruhe und Motivation gegeben hat, waren für das Gelingen dieser Arbeit unabdingbar.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Andreas Aschoff, bei dem ich das nötige Grundlagenwissen über Immunhistochemische Färbungen erlernte. Mit seinem enormen Spezialwissen zur Apoptose hat er mir viele wichtige Anregungen geben können.

Zudem danke ich der Klinik für Innere Medizin III unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.R. Figulla für die Bereitstellung der Biospien, sowie Herrn Dr. U. Lotze, von dem einer der ursprünglichen Impulse zum Thema ausging.

Ebenfalls besonderer Dank gebührt den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau E. Günther und Frau E. Schönfeld für die technische Unterstützung bei der Herstellung der semi-dünnschnitte und ihren Rat bei immunhistochemischen Detailfragen.

Sehr herzlich danke ich meinem Freund Johannes Lemke für das kritische Lektorat dieser Arbeit und seine offene Meinung.

Ich danke vor allen Dingen meinen Eltern, ohne die ich sowohl im biologischen als auch im übertragenen Sinne nicht das wäre, was ich heute bin. Ihre rückhaltlose Unterstützung, die mir bei all meinen Vorhaben sicher war und ihre Erziehung sind mir ein Vorbild. Ich hoffe, daß ich eines Tages die Ausgewogenheit von Verantwortungsbewußtsein, Geduld und Einfühlungsvermögen, mit der ich groß wurde, selber in ähnlicher Weise im Beruf und auch im eigenen Familienleben umsetzen kann.



**Lebenslauf**

Name Ott, Derek Veit Manfred

Adresse Bachstraße 17  
84144 Geisenhausen

geboren am 21.04.1978 in Cuxhaven

Familienstand ledig

1981 Umzug nach El Paso, Texas (USA)

Besuch der amerikanischen Preschool und des Kindergarden

1984 Umzug nach Tholey, Saarland

1984-1988 Besuch der Grundschule Tholey

1988 Übertritt an das Johannes-Kepler-Gymnasium, Lebach

1989 Umzug nach Geisenhausen, Bayern

1989-1997 Besuch des Maximilian-von-Montgelas-Gymnasiums Vilsbiburg

1997 Allgemeine Hochschulreife am 27.06.

seit 1997 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena

1998 Pflegepraktikum in Havanna, Kuba

1999 Ärztliche Vorprüfung

2000 Famulatur (Tropenmedizin) in Lima, Peru

1. Teil der Ärztlichen Prüfung.

2001 Famulatur (Neurologie) in Jena

Famulatur (Kardiologie) in Haugesund, Norwegen

Famulatur (Radiologie) in Konstanz

2002 Erasmus-Auslandssemester an der Universitat Autònoma Barcelona  
(Spanien)

Jena, den 17.01.2003

Derek Ott

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ott, Derek Veit Manfred

Bachstr. 17

84144 Geisenhausen

Hiermit erkläre ich, Derek Veit Manfred Ott, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich diese Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. G.F. Jirikowski und Dr. A. Aschoff, Anatomisches Institut II der FSU Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die vorgelegte Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht,

daß ich weder die gleiche, noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 17.01.2003

Derek Ott